



HAL
open science

Les microplastiques et leurs additifs dans les produits de la pêche : développements méthodologiques et prévalence

Ludovic Hermabessiere

► To cite this version:

Ludovic Hermabessiere. Les microplastiques et leurs additifs dans les produits de la pêche : développements méthodologiques et prévalence. Océan, Atmosphère. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018. Français. NNT : 2018DUNK0492 . tel-02055801

HAL Id: tel-02055801

<https://theses.hal.science/tel-02055801v1>

Submitted on 4 Mar 2019

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.

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Littoral Côte d'Opale

**Ecole Doctorale n° 104
Science de la matière, du rayonnement et de l'environnement (SMRE)**

Spécialité de doctorat : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Préparée par : Ludovic HERMABESSIERE

À : Anses – Laboratoire de sécurité des Aliments – Site de Boulogne sur mer

Les microplastiques et leurs additifs dans les produits de la pêche : développements méthodologiques et prévalence

Soutenu le 12 novembre 2018 devant le jury composé de :

Bruno TASSIN	Professeur, Ecole des Ponts	Président du Jury
Julien GIGAULT	Chargé de recherche, HDR, CNRS	Rapporteur
Catherine MOUNEYRAC	Professeure, Université de Nantes	Rapporteur
Maria-Luiza PEDROTTI	Chargée de recherche, CNRS	Examinatrice
Alexandra TER HALLE	Chargée de recherche, Université Toulouse III	Examinatrice
Guillaume DUFLOS	Ingénieur de Recherche, HDR, Anses	Co-directeur de thèse
Philippe SOUDANT	Directeur de recherche, CNRS	Co-directeur de thèse

« Deux choses sont infinies : l'Univers et la bêtise humaine. Mais en ce qui concerne l'Univers, je n'en ai pas encore acquis la certitude absolue »

Albert Einstein

A mon père, Didier, qui m'a toujours poussé à aller de l'avant.

Ce travail est le fruit de cette exigence.

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) et la région Hauts-de-France (anciennement la région Nord-Pas-de-Calais) qui ont financé et qui m'ont permis d'effectuer ces trois années de travaux de thèse. Je remercie aussi Monsieur Laurent Laloux, directeur du Laboratoire de sécurité des aliments (LSAI) de l'Anses, et Madame Anne Brisabois, directrice du Département des produits de la pêche et de l'aquaculture du LSAI, de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse à Boulogne sur mer au sein de ce département.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Merci à Monsieur Julien Gigault et Madame Catherine Mouneyrac d'avoir été les rapporteurs de ce travail de thèse. Je tiens aussi à remercier les examinateurs du jury, Madame Maria-Luiza Pedrotti, Madame Alexandra Ter Halle et Monsieur Bruno Tassin, d'avoir participé à l'évaluation de cette thèse.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse qui ont, chaque année, répondu présent afin d'apporter un regard extérieur sur l'avancé de ces travaux. Un grand merci donc à Gaël Durand, Fabienne Lagarde, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Emmanuel Rinnert, Gilles Rivière, Christophe Lambert et Alexandre Dehaut.

Je remercie mes deux co-directeurs de thèse, Guillaume Duflos et Philippe Soudant. Merci à tous les deux pour votre soutien, votre confiance et votre disponibilité tout au long de ces trois années. De manière un peu plus individuelle, merci à Guillaume pour ta disponibilité quotidienne, ton attitude positive et ton humour à toute épreuve. Philippe, merci pour ton encadrement depuis le master 2 et pour me pousser toujours plus loin dans mes réflexions.

Ensuite, j'aimerais remercier la « microplastique team » de l'Anses : Charlotte et Alexandre. Merci à tous les deux pour tous les bons moments que nous avons pu passer à échantillonner, digérer, compter sous loupe binoculaire etc. Votre joie et votre bonne humeur quotidienne (ponctué par quelques désaccords) ainsi que votre soutien technique et moral m'a permis de mener à bien ces travaux de thèse. Ceux-ci n'auraient peut-être pas été les mêmes sans vous.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire qui a participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse. Peut-être plus particulièrement Marie-Ange qui a rédigé cette thèse sous Excel à la dernière minute.

Merci aux stagiaires que j'ai pu de près ou de plus loin encadrer : Marion, Béatrice et Marie. Vous m'avez toutes permis d'en apprendre un peu plus sur moi et sur la tâche difficile qu'est l'encadrement. J'espère aussi vous avoir appris quelque chose sur les microplastiques ou sur la rigueur scientifique.

Merci aux doctorants du laboratoire pour avoir contribué à la bonne humeur du bureau. Certains comme Thomas, Yuwalee, Mamadou et Estelle sont désormais docteurs d'autres comme Julia et Arnaud ne le sont pas encore mais le seront bientôt. Merci à tous pour tous les bons moments passés dans le bureau et en dehors. Peut-être un remerciement plus spécifique pour Arnaud qui est arrivé en thèse le même jour que moi et qui soutiendra peu de temps après moi. Je suis très heureux d'avoir pu partager avec toi les bons moments (formation à Lille et d'autres) de nos thèses ainsi que les moins bons, surtout cette dernière année. Merci à toi pour ce soutien lors de la thèse et pendant la phase de rédaction. Une petite dédicace aussi à Julia, arrivée lors du démarrage de la 3^{ème} année et qui a été témoin de la fin de thèse qui n'est jamais la partie la plus drôle. Et merci à tous les deux d'être, comme moi, fan de Star Wars.



Je tiens également à remercier Maria, doctorante au LOG, pour tous les bons moments que nous avons passés lors de tes passages au laboratoire et les analyses Raman réalisées au LOG.

Ce travail de thèse a été aussi l'occasion de quelques déplacements à Brest. Je tiens à remercier Anne-Laure Cassone, Ika Paul-Pont et Emmanuel Rinnert de m'avoir accueilli au LEMAR et au Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures de l'Ifremer pour me permettre de me former à l'observation de MP sous loupe

binoculaire puis l'analyse de ceux-ci par spectroscopie micro-Raman. Je tiens à remercier José Zambonino et Christine Huelvan de m'avoir initié aux dosages enzymatiques qui m'ont permis ensuite de réaliser mes manipulations de lixiviation d'additifs plastiques. Je tiens également à remercier Justine Receveur et Ronan Jezequel de m'avoir accueilli à deux reprises au Cedre pour réaliser les dosages de l'irgafos 168[®]. Je remercie, plus globalement, toutes les personnes de ces laboratoires qui ont rendu mes déplacements très enrichissants.

Merci à tous mes amis de Brest pour les bons moments lors de ces nombreux déplacements. Encore un grand merci à Margaux et Louise, Clémence, Valérie et Emilien pour m'avoir logé lors de mes venues. Venir à Brest, vous voir tous fut un vrai plaisir. Merci à Kévin d'avoir partagé avec moi des bons moments (de répétitions d'oral, de visites etc) lors des deux congrès de cette dernière année. Merci aussi à Fanon d'avoir partagé ces bons moments avec nous lors du congrès de San Diego.

D'un point de vue personnel, je souhaite remercier ma mère, Isabelle, mon frère, Thibault et ma sœur, Charlotte, pour leurs soutiens le long de ces huit années d'études. Merci à mes deux grands-mères, Christiane et Sylviane, de me soutenir aussi dans mon parcours professionnel. Je tiens aussi à remercier ma chérie, Clémence, qui me soutient quotidiennement et qui m'a soutenu (supporté est-il plus approprié ?) lors de ces derniers mois de rédaction. Je tiens aussi à la remercier pour le schéma d'introduction qu'elle a réalisé ainsi que d'avoir pris le temps de lire et corriger ce document (pavé) qui a dû être assez indigeste.

Il est difficile pour moi d'exprimer toute la reconnaissance que j'ai pour les personnes qui ont participé à ce travail de thèse sans m'épandre pendant des pages et des pages. Ce document est déjà bien assez long. Pour finir, afin de n'oublier personne, je tiens à remercier chaque personne qui a contribué de près ou de loin en amenant une pierre à l'édifice. Ceci me permet aujourd'hui d'accomplir quelque chose que je n'imaginai pas possible il y a quelques années, lorsque j'ai effectué mon premier stage (de DUT) dans le milieu de la recherche scientifique.

Sommaire

LISTE DES FIGURES (HORS PUBLICATIONS)	5
LISTE DES TABLEAUX (HORS PUBLICATIONS)	9
ABBREVIATIONS	11
CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	15
AVANT-PROPOS	19
CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART	23
I Le plastique : du matériau « miracle » au polluant microscopique	24
I.1 Plastiques : de la production à la fin de vie	24
I.2 Microplastiques	27
I.2.1 Définitions	27
I.2.2 Sources des microplastiques dans l'environnement marin	29
I.2.3 Pollution des environnements marins par les microplastiques	32
II Microplastiques et produits de la pêche	36
II.1 Ressources halieutiques	36
II.1.1 Production et consommation des produits de la pêche	36
II.1.2 Bénéfices de la consommation des produits de la pêche	39
II.2 Contamination des produits de la pêche par les microplastiques	40
II.2.1 Coquillages et crustacés	40
II.2.2 Poissons frais	46
II.2.3 Produits transformés	56
II.3 Impacts des microplastiques sur les organismes marins	57
II.3.1 Interactions avec le phytoplancton et le zooplancton	58
II.3.2 Interactions avec les bivalves marins	59
II.3.3 Interactions avec les poissons	61
II.3.4 Interactions avec d'autres organismes	61
II.4 Dangers associés pour la consommation humaine	63
II.4.1 Ingestion de microplastiques par la consommation d'invertébrés marins	63
II.4.2 Interactions avec le système digestif	63
II.4.3 Contaminants biologiques	67
II.4.4 Contaminants chimiques	67
III Méthodes de détection et de caractérisation des microplastiques dans les produits de la pêche	73
III.1 Détection des microplastiques	73
III.2 Caractérisation chimique des microplastiques	79
III.2.1 Spectroscopie Raman	79
III.2.2 Spectroscopie FTIR	80
III.2.3 Pyrolyse-GC/MS	80
III.2.4 Autres méthodes de caractérisation des microplastiques	82
III.2.5 Avantages et inconvénients des principales techniques de caractérisation des microplastiques	84

CHAPITRE 2 DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES	87
Préambule	88
I Sélection, optimisation et limites d'un protocole pour extraire les microplastiques des tissus des produits de la pêche	89
I.1 Sélection d'un protocole de digestion des tissus des produits de la pêche permettant la recherche des microplastiques	89
I.1.1 Introduction	89
I.1.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 2	90
I.1.3 Article 2 : Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization	91
I.2 Optimisation des conditions de digestion des tubes digestifs de poissons	116
I.2.1 Introduction	116
I.2.2 Matériel et méthodes	116
I.2.3 Résultats et discussion	119
I.2.4 Conclusion	121
I.3 Détermination des masses limites des tractus gastro-intestinaux de poisson pour l'analyse des microplastiques	121
I.3.1 Introduction	121
I.3.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 3	122
I.3.3 Article 3 : Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method.	123
II Optimisation, performances et application d'une méthode de Pyrolyse-GC/MS pour caractériser les microplastiques	138
II.1 Introduction	138
II.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 4	139
II.3 Article 4 : Optimization, performance and application of a Pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics	140
III Discussion du chapitre	169
CHAPITRE 3 MICROPLASTIQUES DANS LES PRODUITS DE LA PECHE	173
Préambule	174
I Contamination de deux espèces de bivalves le long des côtes de la Manche	175
I.1 Introduction	175
I.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 5	176
I.3 Article 5 : Microplastic contamination and associate pollutant in mussels and cockles along the French English Channel coasts	177
II Contamination d'espèces de poissons	195
II.1 Introduction	195
II.2 Matériel et méthodes	195
II.2.1 Echantillonnage	195
II.2.2 Analyse des microplastiques	197
II.2.3 Analyses des polluants organiques hydrophobes et des additifs plastiques	198
II.2.4 Analyses statistiques	201
II.3 Résultats et discussion	201
II.3.1 Paramètres biométriques des animaux	201

II.3.2	Contamination des poissons par les microplastiques	203
II.3.3	Contamination des poissons par les polluants organiques hydrophobes et les additifs plastiques	207
III	Discussion du chapitre	210
CHAPITRE 4 ÉTUDE EXPLORATOIRE DE LA LIXIVIATION D'UN ADDITIF PLASTIQUE EN CONDITION DIGESTIVE IN VITRO		213
I	Lixiviation de l'irgafos 168[®]	214
I.1	Introduction	214
I.2	Matériel et méthodes	215
I.2.1	Modèle enzymatique de digestion in vitro	215
I.2.2	Lixiviation de l'irgafos 168 [®]	216
I.2.3	Analyses statistiques	224
I.3	Résultats	225
I.3.1	Vérification préliminaire de l'activité des enzymes utilisées pour l'étude de lixiviation	225
I.3.2	Lixiviation de l'irgafos 168 [®] en conditions digestives in vitro	229
I.4	Discussion	232
II	Détection de l'irgafos 168[®] dans les emballages et les produits chimiques utilisés dans l'étude de lixiviation	234
II.1	Introduction	234
II.2	Matériel et méthodes	234
II.3	Résultats	235
II.4	Discussion	237
III	Conclusion du chapitre	238
CHAPITRE 5 DISCUSSIONS, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS		239
I	L'étude des microplastiques dans les produits de la pêche : harmonisation des méthodes et des définitions	240
I.1	Harmoniser les méthodes d'études des microplastiques dans les produits de la pêche vers une possible comparaison des données	240
I.2	Les microplastiques : une histoire de taille	245
II	Contamination des produits de la pêche par les microplastiques	247
III	Les additifs plastiques : un danger peu étudié	254
IV	Conclusion générale	256
BIBLIOGRAPHIE		257
ANNEXES		297
Annexe 1 : Article 1 : Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review		298
Annexe 2 : Fichier type de prise en compte des blancs dans le comptage des microplastiques dans les TD et les filets des poissons		314
RESUME		317
ABSTRACT		317

Liste des figures (hors publications)

- Figure 1 : Evolution de l'utilisation du poisson (en millions de tonnes), de la population de la planète (en milliards de personnes) et de l'offre de poisson destinée à la consommation humaine (en kg/personne). D'après FAO (2018a). 19
- Figure 2 : Nombre de publications scientifiques entre 2004 et 2018 (recherche effectuée le 18/09/2018) après une recherche sur Scopus avec les mots clés « microplastic* » et « plastic AND debris ». 20
- Figure 3 : Production mondiale de matière plastique (en Mt) entre 1950 et 2015. Cette production inclut la production de résine et la production de fibres plastiques. D'après Geyer *et al.* (2017). 25
- Figure 4 : Granulés pour l'industrie (GPI) récoltés sur la plage d'Equihen (62) (A) et microbilles de Polyéthylène retrouvées dans un produit cosmétique (B). 29
- Figure 5 : Schéma représentant les sources primaires et secondaires des microplastiques dans l'environnement marin. I correspond à des sources primaires et II à des sources secondaires de microplastiques. 32
- Figure 6 : Estimation de la densité de microplastiques (item/km²) à la surface des océans. D'après van Sebille *et al.* (2015). 33
- Figure 7 : Schéma représentant les changements subis par les MP dans la colonne d'eau. Ces changements, incluant l'ecocorona, l'incorporation dans les fèces et dans les neiges marines (agrégat de phytoplancton), entraînent les MP vers le fond des océans. D'après Galloway *et al.* (2017) 35
- Figure 8 : Evolution de la production de la pêche mondiale (en millions de tonnes) entre 1950 et 2014. L'aire sous la courbe en orange représente la production de la pêche de capture et l'aire sous la courbe en turquoise représente la production de l'aquaculture. D'après FAO (2018a). 36
- Figure 9 : Evolution de la production aquacole mondiale (en millions de tonnes) entre 1990 et 2016. Les données sont classées en fonctions des groupes d'espèces produites. D'après FAO (2018a). 38
- Figure 10 : Evolution de la consommation française des produits aquatiques (en kg de poids vif/habitant/an) entre 1998 et 2015. * Les données de 2015 sont des estimations. D'après FranceAgriMer (2017) 39
- Figure 11 : Comparaison entre les concentrations de MP utilisées dans les études d'exposition (lignes de couleur grasse) et les niveaux environnementaux observés (losanges rouges: concentrations moyennes, barres d'erreur: concentration minimale et maximale). La ligne rouge extrapole les données de terrain avec le meilleur ajustement en utilisant une régression de la loi de puissance (intervalles de confiance de 95% sous forme de zones rouge pâle). D'après Lenz *et al.* (2016). (1) Sussarellu *et al.* (2016) ; (2) von Moos *et al.* (2012) ; (3) Browne *et al.* (2008) ; (4) Besseling *et al.* (2013) ; (5) Cole *et al.* (2015) ; (6) Lee *et al.* (2013) ; (7) Cole *et al.* (2013) ; (8) Besseling *et al.* (2014). 58
- Figure 12 : Produits chimiques associés aux microplastiques et aux débris plastiques marins en général. Ces produits chimiques sont les additifs plastiques (« Chemical Ingredients » et « Chemical Byproducts ») et les polluants adsorbés à la surface (« Sorbed Contaminant »). D'après Rochman (2015). 68

- Figure 13 : Schéma d'un Pyrolyse-GC/MS. D'après Tsuge *et al.* (2011). 81
- Figure 14 : (A) Pyrogramme de Polyéthylène haute densité (PEHD) ; (B) Spectre de masse moyen du Polyéthylène haute densité (PEHD). D'après Tsuge *et al.* (2011). 81
- Figure 15 : Démarche expérimentale de l'analyse comparative de six protocoles en vue de l'extraction et de l'identification des MP des produits de la pêche. 91
- Figure 16 : Représentation des paramètres étudiés dans le plan d'expérience visant à évaluer les paramètres optimaux pour la digestion des tubes digestifs de poisson. 117
- Figure 17 : Démarche expérimentale pour déterminer la masse limite des TGI pour la digestion au KOH 10% puis la filtration. 123
- Figure 18 : Démarche expérimentale de l'optimisation, de l'évaluation des performances et de l'application d'une méthode de Pyrolyse-GC/MS pour identifier des microplastiques. 140
- Figure 19 : Démarche expérimentale pour l'analyse de microplastiques et des polluants associés chez deux espèces de bivalves, la moule et la coque, échantillonnées le long des côtes de la Manche. 177
- Figure 20 : Carte d'échantillonnage des poissons (Soles, Maquereaux et Merlans) en Manche orientale et en mer du Nord. Le point rouge correspond à la localisation de pêche des Soles, les points verts correspondent aux localisations de pêche des Maquereaux et les points orange à ceux des Merlans. 196
- Figure 21 : Photographie des fragments identifiés comme du polystyrène (A & B), du polystyrène potentiel (C) et non identifié (D) provenant des tractus gastro-intestinaux des soles. 204
- Figure 22 : Histogramme de la concentration moyenne (ng/g) \pm l'intervalle de confiance à 95% en polluants. A) Σ_{HAP} , Σ_{PBDE} , Σ_{POC} , Σ_{PCB} et B) Σ_{Phtalate} dans les filets de Maquereaux, Merlans et Soles échantillonnés en Manche et Mer du Nord. HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique ; PBDE : Polybromodiphényléther ; PCB : Polychlorobiphényle ; POC : Pesticide organochloré. 209
- Figure 23 : Activités spécifiques (en U/mg de protéines) moyennes des enzymes incubées à 20°C (A) et activités volumiques (en U/mL de solution) moyennes des enzymes incubées à 37°C (B), au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type (n=3). Deux points identifiés par deux lettres différentes matérialisent l'existence d'une différence significative au seuil de 5% d'erreur (HSD Tukey). 227
- Figure 24 : Concentrations moyennes (\pm S.D) de l'irgafos 168 (en ng/filtre) sous sa forme oxydée dans les filtres obtenues après incubation de 0 et 8h pour le modèle poisson à 20°C (A) et le modèle humain à 37°C (B). * : différence significative au cours du temps (entre 0 et 8h) de la concentration de l'irgafos 168 oxydé (Test T, p<0,05). EDM : Eau de mer artificielle. 230
- Figure 25 : Concentrations moyennes (\pm S.D) de l'irgafos 168 (en ng) sous sa forme oxydée dans les filtrats et dans les filtres (en ng/filtre) obtenues après incubation de 8h pour le modèle poisson à 20°C (A) et le modèle humain à 37°C (B). Les étoiles correspondent à un niveau de différences significatives entre les deux matrices de dosages de la concentration de l'irgafos 168 oxydé (Test T). NS : non significatif ; * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001. EDM : Eau de mer artificielle. 231

Figure 26 : Oxydation de l'irgafos 168[®] (tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite) sous forme réduite en sa forme oxydée tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate. D'après Yang *et al.* (2016). 233

Figure 27 : Pyrogramme obtenu après Py-GC/MS de particules de PE-Irg. La flèche verte indique l'irgafos 168[®] sous sa forme réduite et la flèche rouge sous sa forme oxydée. 235

Figure 28 : Schéma de différentes formes (fragment, microbille et fibre) de microplastiques ayant une longueur maximale équivalente de 5 mm. Pour chaque forme, le volume (en mm³) et la masse pour un microplastique de PE (en mg et µg) ont été calculés. 247

Liste des tableaux (hors publications)

Tableau 1 : Différents types de polymères plastiques du « Big six » et leurs caractéristiques.	26
Tableau 2 : Production de la pêche de capture et de l'aquaculture (en millions de tonnes) entre 2011 et 2016. D'après FAO (2018a)	37
Tableau 3 : Contamination par les microplastiques des invertébrés marins consommés par l'Homme	43
Tableau 4 : Contamination des tractus gastro-intestinaux par les microplastiques des espèces du milieu naturel d'Elasmobranches consommés par l'Homme.	48
Tableau 5 : Récapitulatif des différentes études ayant été réalisées pour trouver une solution digérant les tissus des produits de la pêche sans dégrader les polymères plastiques les plus répandus.	74
Tableau 6 : Comparatif avec les avantages et les inconvénients des techniques les plus utilisées pour la caractérisation des MP dans les produits de la pêche.	85
Tableau 7 : Récapitulatif des différents paramètres de digestion des TGI de merlans. La vitesse d'agitation (300 rpm), le temps (24h) et la température d'incubation (60°C) étaient fixes pour tous ces essais.	119
Tableau 8 : Récapitulatif des pourcentages et nombre de filtres exploitables pour la recherche de MP suite à la digestion de TGI de merlans.	121
Tableau 9 : Récapitulatif des produits chimique dosés dans les digestats de filets de poissons.	199
Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres biométriques des individus utilisés dans l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%. Les lettres représentent des différences significatives au seuil $\alpha=5\%$ après des Kruskal-Wallis suivi de test post-hoc. Les différences sont à considérer pour chaque paramètre biométrique en fonction des espèces de poissons.	202
Tableau 11 : Contamination aux MP-like et aux MP des tractus gastro-intestinaux de soles échantillonnées en Manche. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'intervalle de confiance 95%.	203
Tableau 12 : Contamination aux MP-like et aux MP des filets de soles, de merlans et de maquereaux échantillonnées en Manche et en mer du Nord. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'intervalle de confiance 95% et les lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha=5\%$ après tests de Kruskal-Wallis suivi de test post-hoc.	206
Tableau 13 : Activités spécifiques (en U/mg de protéines) de la pepsine, la trypsine, l'amylase et la lipase chez des espèces de poissons marins.	215
Tableau 14 : Conditions expérimentales d'incubation des solutions enzymatiques.	218
Tableau 15 : Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines des enzymes d'après la méthode de Bradford (1976).	219
Tableau 16 : Préparation des échantillons et des blancs pour le dosage de l'activité de la pepsine d'après la méthode Worthington (1993).	219
Tableau 17 : Préparation des échantillons et des blancs pour le dosage de l'activité de l'amylase d'après la méthode de Métais et Bieth (1968)	222
Tableau 18 : Récapitulatif pour la préparation de la gamme d'irgafos 168 oxydé et réduit en vue du dosage par GC-MS/MS.	224

Tableau 19 : Gamme (minimum – maximum) des activités spécifiques (U/mg de protéines) mesurées et trouvées dans la littérature pour les différentes enzymes considérées	228
Tableau 20 : Gamme (minimum – maximum) des activités volumiques (U/mL de solution) mesurées et trouvées dans la littérature (Minekus <i>et al.</i> , 2014) pour les différentes enzymes considérées. Ici pour la pancréatine, seule la valeur de la trypsine est reportée car elle sert de valeur de référence pour le mélange pancréatique.	229
Tableau 21 : Liste des produits chimiques utilisés pour la recherche d'irgafos 168 [®] sous ses formes réduite et oxydée dans les emballages et dans les poudres.	234
Tableau 22 : Récapitulatif de la présence de l'irgafos 168 [®] sous ses formes réduite et oxydée dans les emballages et dans les poudres.	236
Tableau 23 : Récapitulatif des informations indispensables (I) et facultatives (F) à retrouver dans une publication sur les microplastiques dans les produits de la pêche. Adapté d'après Bustin <i>et al.</i> (2009)	244
Tableau 24 : Apport de différents aliments dans la contribution à la consommation humaine de microplastiques. Les données de consommation des différents produits ont été obtenues dans l'étude INCA 2 (Anses, 2016) à l'exception des données concernant les produits de la pêche qui proviennent de l'étude CALIPSO (Leblanc, 2006).	253

Abbréviations

A

ABS : Acrylonitrile Butadiène Styrène

AC : Acétate de Cellulose

B

BBP : phtalate de benzyle et de butyle

BPA : Bisphénol A

BSA : Albumine de Sérum Bovin

C

CIS : Cooled Injection System

D

DEHP : Diethylhexyl phtalate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E

EA-IRMS : Analyse élémentaire couplée à spectrométrie de masse à ratio isotopique

EDS : Analyse dispersive en énergie

EVA : Éthylène-Acétate de Vinyle

F

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FTIR : Infra-Rouge à Transformée de Fourier

G

GC : Chromatographie Gazeuse

GC-MS/MS : Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse en tandem

GESAMP : Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

GPI : Granulé pour l'industrie

H

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HBCD : Hexabromocyclododécane

HOC : Composés organiques hydrophobes

L

L-BAPNA : N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LOD : Limite de Détection

LOQ : Limite de Quantification

LRI : indice de rétention linéaire

M

MFSD : Marine Strategy Framework Directive

MP : Microplastique

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MS : Spectrométrie de Masse

N

NOAA : National Oceanic and Atmospheric Administration

O

OSPAR : Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est

P

PA : Polyamide

PA-12 : Polyamide 12

PA-6 : Polyamide 6

PBAT : Polybutylène adipate terephthalate

PBDE : Polybromodiphényléther

PBT : Poly- β -hydroxybutyrate

PCB : Polychlorobiphényle

PE : Polyéthylène

PEBD : Polyéthylène Basse Densité

PEHD : Polyéthylène Haute Densité

PET : Poly(Téréphtalate d'Éthylène)

PFTE : Polytétrafluoroéthylène

PLA : Acide Polylactique

PMMA : Polyméthacrylate de Méthyle

POC : Pesticides organochlorés

POP : Polluants Organiques Persistants

PP : Polypropylène

PS : Polystyrène

PSe : Polystyrène expansé

PSXL : Polystyrène cross-linked

PUR : Polyuréthane

PVC : Polychlorure de Vinyle

Py-GC/MS : Pyrolyse-Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de masse

R

RFB : Retardateurs de Flammes Bromés

rpm : Tours par minutes

S

S.D : Écart-type

S.E : Erreur-type

SAN : Styène-Acrylonitrile

SBR : Poly(Styrène/Butadiène)

SEM : Microscope électronique à balayage

SEM-EDS : Microscopie électronique à balayage couplé à l'analyse dispersive en énergie

STEP : Stations d'épurations

T

TBBPA : Tétrabromobisphénol A

TDU : Thermal Desorption Unit

TED-GC/MS : Analyse thermogravimétrique réalisée sur phase solide couplée à un désorbeur thermique couplé à une GC/MS

TGA-DSC : Analyse thermogravimétrique couplée à la calorimétrie différentielle à balayage

TOF-SIMS : Spectrométrie de masse à ionisation secondaire temps de vol

U

uPVC : PVC non plastifié

UV : Ultra-Violet

Contributions scientifiques

Articles scientifiques acceptés

Hermabessiere, L., Himber, C., Boricaud, B., Kazour, M., Amara, R., Cassone, A.-L., Laurentie, M., Paul-Pont, I., Soudant, P., Dehaut, A., Duflos, G., 2018. Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 6663-6676. doi: 10.1007/s00216-018-1279-0 (Article 4)

Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*. 182, 781-793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.096 (Article 1)

Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., **Hermabessiere, L.**, Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*. 215, 223-233. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.018 (Article 2)

Articles scientifiques en cours de soumission

Hermabessiere L., Cassone A.L., Himber C., Receveur J., Jezequel R., Rinnert E., El Rakwe M., Rivière G., Lambert C., Huvet A., Dehaut A., Paul-Pont I., Duflos G. & Soudant P., in prep. Microplastic contamination and associated pollutant in mussels and cockles along the French English Channel coasts. *Marine Pollution Bulletin*. (Article 5)

Doyen P., **Hermabessiere L.**, Dehaut A., Himber C., Decodts M., Degraeve T., Delord L., Gaboriaud M., Moné P., Sacco J., Tavernier E., Grard T., & Duflos G. Submitted. Microplastics occurrence and identification in beach sediments from the “Hauts-de-France” Region: a citizen scientific project. *Marine Pollution Bulletin*.

Dehaut A., **Hermabessiere L.**, Himber C., Paul-Pont I., Soudant P., Duflos G., in prep. Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method. *Environmental Pollution*. (Article 3)

Dehaut A., **Hermabessiere L.** & Duflos G., in prep. Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood. *Trends in Analytical Chemistry*.

Communication orales

Hermabessiere L., Zambonino-Infante J.L., Receveur J., Himber C., Paul-Pont I., Dehaut A., Jezequel R., Soudant P., Duflos G. Study of the leaching from microplastics using an in vitro enzymatic digestion model. Sixth International Marine Debris Conference. 12-16 Mars 2018. San Diego, USA

Hermabessiere L., Zambonino-Infante J.L., Receveur J., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant P., Duflos G., 2017. Leaching of a common antioxidant additive (Irgafos 168) from microplastics using an in vitro enzymatic model of digestion. International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea. 26-28 Septembre 2017. Capri, Italie

Hermabessiere L., Dehaut, A., Cassone, A.N., Frère L., Himber C., Rinnert E., Rivière G., Lambert C., Soudant P., Huvet A., Duflos G., Paul-Pont I., 2017. Identification of an optimized protocol for extraction and characterization of microplastics in seafood products. ECSafeSeafood Final Conference. 25-26 Janvier 2017. Bruxelles, Belgique

Hermabessiere L., Les microplastiques dans les produits de la pêche et de l'aquaculture, 2016. Journée du campus de la mer, 20 Octobre 2016. Boulogne sur mer, France

Communications affichées

Hermabessiere L., Boricaud., Himber C., Duflos G., Dehaut A. Microplastics identification by Py-GC/MS: method optimization and validation. Sixth International Marine Debris Conference. 12-16 Mars 2018. San Diego, USA

Hermabessiere L. Etude de la lixiviation d'un antioxydant de microplastiques en utilisant un modèle enzymatique in vitro de digestion. Journée des Doctorants de l'Anses, 25 et 26 Octobre 2017. Maisons-Alfort, France

Hermabessiere L., Boricaud., Himber C., Duflos G., Dehaut A. Optimization and validation of a Pyrolysis-GC/MS method to identify microplastics. 3ème colloque international francophone en environnement et santé. 23-25 Octobre 2017. Dunkerque, France

Hermabessiere, L., Himber, C., Duflos G., Dehaut A., 2017. Pyrolysis-GC/MS: a powerful tool for microplastics identification. ECSafeSeafood, 25-26 Janvier 2017. Bruxelles, Belgique

Hermabessiere L., Dehaut, A., Cassone, A.N., Frère L., Himber C., Rinnert E., Rivière G., Lambert C., Soudant P., Huvet A., Duflos G., Paul-Pont I., 2016. Identification of an optimized protocol for extraction and characterization of microplastics in seafood products. Journée des Doctorants de l'Anses, 6 Octobre 2016. Maisons-Alfort, France

Encadrement scientifique

Boricaud Béatrice, Stage de Master 2, Master Chimie Analytique et Qualité, Université de Poitiers, 2017. Mise au point et validation d'une méthode d'analyse de microplastiques par Pyrolyse-GC/MS.

Gournay Marion, Stage de 2^{ème} année de DUT, IUT Génie Biologique option industries agroalimentaires et biologiques, Université Littoral Côte d'Opale, 2016. Recherche et analyses des microplastiques dans les produits de la pêche.

Avant-Propos

Depuis le début des années 1950 jusqu'à aujourd'hui, la production de produits de la pêche ainsi que leur consommation sont en constante augmentation (Figure 1) (FAO, 2018a). Cette augmentation de l'offre de produits de la pêche pour la consommation humaine est concomitante avec l'augmentation de la population humaine (Figure 1). La production aquacole supporte majoritairement l'offre de produits de la pêche depuis quelques années du fait de l'augmentation de sa proportion dans l'offre globale et de la stagnation de la pêche de capture dû à la diminution des ressources (FAO, 2018a) et à l'application de quota dans beaucoup de pays. Les produits de la pêche sont aussi considérés comme des aliments de qualité par la population, ceci pouvant expliquer une consommation importante de ces produits au cours des dernières années.

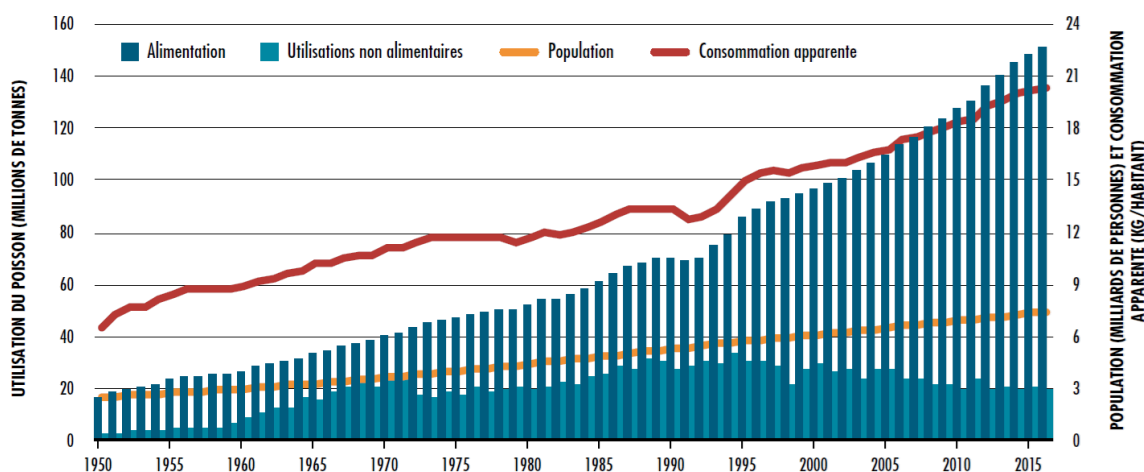


Figure 1 : Evolution de l'utilisation du poisson (en millions de tonnes), de la population de la planète (en milliards de personnes) et de l'offre de poisson destinée à la consommation humaine (en kg/personne). D'après FAO (2018a).

Dans le même temps, la consommation alimentaire globale des ménages est en augmentation, notamment en France et les habitudes alimentaires des consommateurs français sont en constante évolution avec une augmentation récente de la part des plats transformés et préparés (INSEE, 2015b). Ce changement d'habitude de consommation, entraîne une augmentation de la quantité de plastique à usage unique produit par la population. Néanmoins, l'augmentation de la production de la matière plastique est aussi observée dans d'autres domaines d'applications et ce depuis les années 1950 (Geyer *et al.*, 2017). Mondialement, la production a atteint 335 millions de tonnes en 2016 (PlasticsEurope, 2018). Actuellement, une partie de cette production plastique ne passe pas par les systèmes de retraitement des déchets à cause d'une mauvaise gestion, d'un mauvais comportement de la part des consommateurs (décharge sur la voie publique...) ou d'un faible recyclage de certains polymères, entraînant la présence de déchets plastiques, notamment dans l'environnement marin. Les activités de

pêche en mer sont aussi responsables d'une partie de la présence de déchets plastiques dans cet environnement.

Les premières descriptions de la présence de plastiques dans les océans et les organismes marins datent du début des années 1970. En effet, en 1969, [Kenyon et Kridler \(1969\)](#) a décrit la présence de plastique dans des carcasses d'albatros (*Diomedea immutabili*) retrouvés sur les plages hawaïennes. Une année plus tard, en 1970, [Buchanan \(1971\)](#) a montré la présence de fibres synthétiques colorées dans les eaux des côtes de Northumberland (Angleterre). En 1972, [Carpenter et al. \(1972\)](#) a mis en évidence la présence de sphérule dans les eaux côtières de Nouvelle-Angleterre (USA) ainsi que dans des poissons vivants dans cette région. A la suite de ces travaux, peu d'études ont été réalisées entre les années 1970 et le début des années 2000. Néanmoins, depuis 2004 et l'étude de [Thompson et al. \(2004\)](#) sur la présence de microplastiques (MP) dans les sédiments et les eaux anglaises, le nombre d'études publiées avec les mots clés « microplastic* » et « plastic AND debris » est en augmentation rapide (Figure 2). Le nombre d'article publiés entre 2004 et 2018 avec le mot clé « microplastic* » est de 1 703 alors qu'avec les mots clés « plastic AND debris » est de 2 043 et la réunion des deux recherches conduit à l'obtention de 327 articles. Il est à noter que le nombre d'articles publiés avec le mot clés microplastic* dépasse depuis 2016 le nombre d'article publié avec les mots clés « plastic AND debris ».

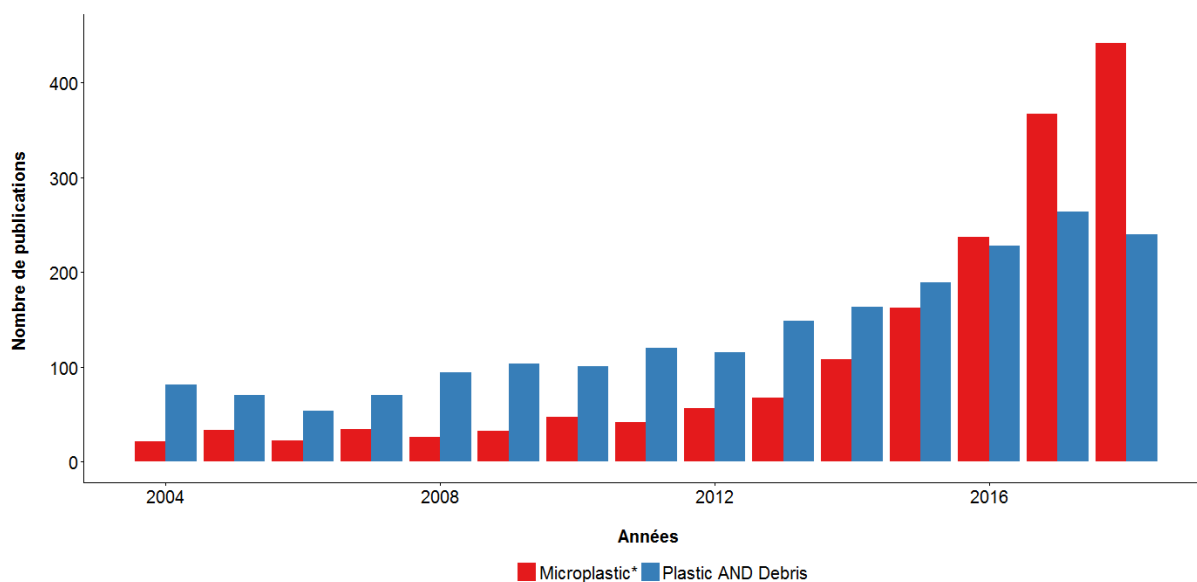


Figure 2 : Nombre de publications scientifiques entre 2004 et 2018 (recherche effectué le 18/09/2018) après une recherche sur Scopus avec les mots clés « microplastic* » et « plastic AND debris ».

Bien que le nombre croissant de publications scientifique permette de mieux comprendre les sources, la dynamique, le devenir et l'occurrence dans les environnements marins ainsi que l'interaction de ces microplastiques avec les organismes, un certain nombre de questions reste

toujours en suspens. En effet, à ce jour, peu d'études ont été réalisées afin de déterminer les potentiels dangers de ces particules pour l'Homme. En outre, l'Homme peut ingérer ces particules via la consommation de produits de la pêche. De plus, les plastiques sont considérés comme des « cocktails » de produits chimiques. Certaines molécules, les additifs plastiques, sont ajoutées aux polymères lors de la fabrication de ceux-ci et peuvent être nocives pour l'Homme. De plus, lors de leur séjour dans l'environnement marin, la surface des plastiques peut adsorber un certain nombre de produits chimiques incluant des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB) et des métaux lourds. Ce travail de thèse a été effectué afin de produire des éléments de réflexion, d'harmonisation et des données chiffrées pouvant servir de jalons pour, *in fine*, évaluer les dangers liés aux microplastiques pour le consommateur des produits de la pêche.

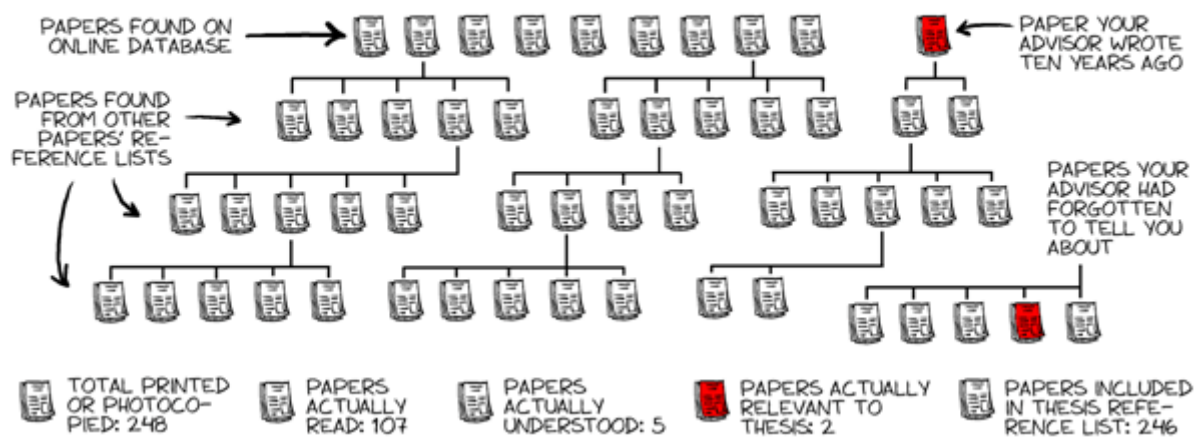
Dans ce contexte, ce manuscrit se compose de cinq chapitres différents. Le **Chapitre 1** présente un état de l'art rappelant dans un premier temps quelques concepts essentiels sur la matière plastique suivi dans un deuxième temps d'une étude approfondie de la contamination et des effets des microplastiques sur les produits de la pêche, le tout remis dans le contexte des dangers associés à la consommation humaine. Dernièrement, le Chapitre 1 présente les différentes techniques permettant l'étude des microplastiques dans les produits de la pêche. Le **Chapitre 2** présente des développements méthodologiques permettant une harmonisation des études. Dans un premier temps, un développement méthodologique a été effectué afin de sélectionner le produit chimique permettant de digérer les tissus des produits de la pêche sans dégrader les plastiques. Dans un second temps, des limites pour ce protocole ont été déterminées. Dans un dernier temps, une méthode de Pyrolyse-GC/MS a été optimisée, comparée à une autre méthode d'identification des polymères plastiques puis employée sur des microplastiques provenant de différentes matrices environnementales. Ces différentes techniques développées dans ce travail de thèse ont ensuite été utilisées dans le **Chapitre 3**. Ce chapitre a eu pour but de déterminer l'occurrence de microplastiques et de polluants associés dans différents produits de la pêche. Le **Chapitre 4** présente la mise en place de modèles enzymatiques de digestion *in vitro* pour le poisson et l'Homme puis l'étude de la lixiviation d'un additif plastique, l'Irgafos 168[®], à l'aide de ces modèles. Enfin, le **Chapitre 5** discute les principaux résultats obtenus lors ce travail de thèse en les remettants dans le contexte plus global de l'étude des microplastiques dans l'environnement ainsi que dans les organismes. Pour conclure, ce chapitre 5 propose des pistes afin d'améliorer et d'harmoniser les études sur les microplastiques dans les produits de la pêche afin d'évaluer le risque pour le consommateur.

Chapitre 1 Etat de l'art

REFERENCES

MAKING SURE NO ONE HAS ALREADY WRITTEN YOUR THESIS

phd.stanford.edu
JORGE CHAM © STANFORD DAILY



I Le plastique : du matériau « miracle » au polluant microscopique

I.1 Plastiques : de la production à la fin de vie

Dans cette première partie, il est important de rappeler quelques notions sur les matériaux plastiques ou plus communément appelé « plastiques ».

Le matériau plastique est composé entre autre d'un polymère synthétique qui est défini comme une macromolécule composée d'une succession covalente de molécules (IUPAC, 2006), appelées aussi monomères (Aucher, 2009). Les polymères plastiques sont classés en trois grandes catégories : les thermodurcissables, les thermoplastiques et les élastomères. La différence principale entre ces catégories de polymères est due à la manière dont est créé le polymère à partir du monomère (Aucher, 2009). Les thermodurcissables sont des plastiques qui possèdent des liaisons chimiques covalentes, c'est-à-dire très fortes et qui ont des formes tridimensionnelles. Ces plastiques sont mis en forme sous l'action de la chaleur et cette transformation est irréversible (Chatain, 1998b). Contrairement aux thermodurcissables, les thermoplastiques ont une structure linéaire et peuvent être modelés de manière réversible. En effet, à forte température ces polymères deviennent malléables et la diminution de la température les rend solides (Chatain, 1998a). La fabrication des élastomères a la propriété de rendre ces plastiques élastiques c'est-à-dire qu'ils reviennent à leur état initial après étirement. Les polymères thermoplastiques sont les plus abondants car ils représentent 90% des applications des polymères plastiques (PlasticsEurope, 2016).

L'élaboration de polymères plastiques nécessite plusieurs étapes avant d'obtenir le produit final. Les deux étapes finales sont la polymérisation et la polycondensation (Fontanille et Gnanou, 2014). La polymérisation consiste à lier les monomères entre eux de manière linéaire afin de créer la chaîne polymérique, le tout à l'aide d'un catalyseur. La polycondensation consiste à enlever les petites molécules, l'eau par exemple, pour former le polymère par condensation chimique (Fontanille et Gnanou, 2014). Lors de la création des polymères plastiques, d'autres substances sont ajoutées incluant des additifs plastiques (OECD, 2004). Ces derniers sont des produits chimiques qui confèrent des propriétés désirées aux polymères plastiques ou qui sont incorporés afin de faciliter la fabrication de la matière plastique (OECD, 2004). Les additifs plastiques sont principalement utilisés pour leurs propriétés de plastifiants, retardateurs de flammes, stabilisants, antioxydants ou pigments. Le type et la quantité d'additifs plastiques incorporés dans un polymère dépend principalement des propriétés attendues du produit final.

La matière plastique tient une place importante dans la société, que ce soit dans le domaine domestique ou industriel (Andrady et Neal, 2009). Les propriétés multiples de ce matériau, comme sa robustesse, sa légèreté, sa durabilité, son faible coût et sa facilité de production (Thompson *et al.*, 2009), en font un matériau utilisable au quotidien par tous et dans de nombreux domaines d'applications. La création du premier polymère synthétique par L. Baekeland date de 1909 (Baekeland, 1909; Fontanille et Gnanou, 2014). La production de matière plastique est en constante augmentation depuis les années 1950 (Figure 3).

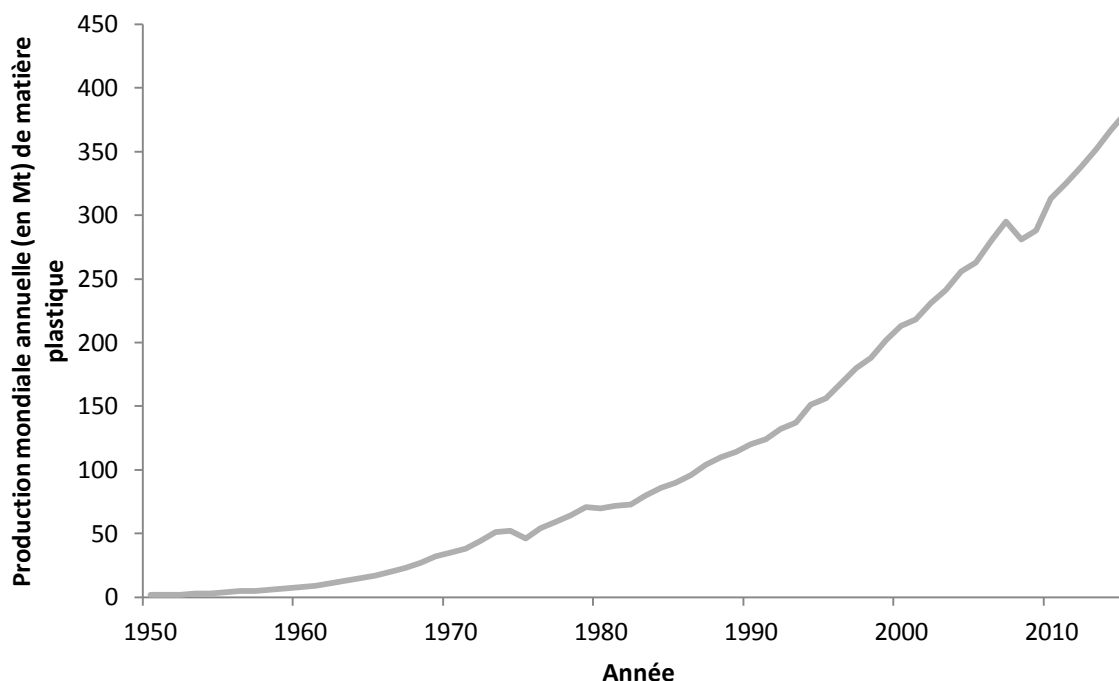


Figure 3 : Production mondiale de matière plastique (en Mt) entre 1950 et 2015. Cette production inclut la production de résine et la production de fibres plastiques. D'après Geyer *et al.* (2017).

En 2016, la production mondiale de plastique (hors fibres) a atteint 335 millions de tonnes, ce qui a représenté une augmentation de 49% depuis 2004 où la production était de 225 millions de tonnes (PlasticsEurope, 2016, 2018). Il est important de noter que ces chiffres n'ont pas pris en compte les fibres synthétiques. En effet, en 2013 la production de fibres synthétiques était de 54 millions de tonnes (Industrievereinigung Chemiefaser, 2013), ce qui peut représenter en fonction des années une sous-estimation de la production plastique de 15 à 20% en comparaison avec les données de PlasticsEurope (Industrievereinigung Chemiefaser, 2013; PlasticsEurope, 2018). Les estimations prédisent un doublement de la production mondiale de matière plastique d'ici à 2025, si aucune mesure de réduction n'est prise (World Economic Forum, 2016).

Sur la cinquantaine de polymères plastique différents, seuls six sont produits de manière industrielle (Andrady et Rajapakse, 2017). Ces polymères plastiques sont aussi appelés les polymères de commodité ou de grande diffusion et sont les suivants : le Polyéthylène (PE) (comprenant le Polyéthylène Haute Densité (PEHD) et le Polyéthylène Basse Densité (PEBD)), le Polypropylène (PP), le Polystyrène (PS), le Polychlorure de vinyle (PVC), le Poly(téréphtalate d'éthylène) (PET) et le Polyuréthane (PUR). Parmi ces six polymères seul le PUR est un plastique thermdurcissable. Ces six polymères, appelés aussi « Big Six », représentaient plus de 80% de la demande de plastique en Europe en 2016 (PlasticsEurope, 2018). Ils sont utilisés pour différentes applications de part leurs caractéristiques différentes : monomère de base et densité par exemple (Tableau 1).

Tableau 1 : Différents types de polymères plastiques du « Big six » et leurs caractéristiques.

Polymères	Utilisation principale	Densité	Monomère
PE	Film agricole, emballage alimentaire, jouet, bouteilles	0,90 – 0,97	
PP	Emballage alimentaire, tuyau, pièces automobile	0,83 – 0,90	
PS	Vaisselle jetable, emballage alimentaire, isolation	1,04 – 1,05	
PVC	Fenêtre, câble, sol, isolant	1,38 – 1,4	
PET	Bouteille	1,34 – 1,37	
PUR	Isolant, oreiller, matelas	1,2	

PE : Polyéthylène (Haute et Basse Densité) ; PP : Polypropylène ; PS : Polystyrène ; PVC : Polychlorure de vinyle ; PET : Poly(téréphtalate d'éthylène) ; PUR : Polyuréthane.

Dernièrement, une autre catégorie de plastique est apparue : les bioplastiques. Néanmoins, il faut faire attention avec ce terme qui est générique. En effet, sous cette appellation, il existe plusieurs types de bioplastiques : les plastiques bio-sourcés, fabriqués (partiellement) avec de la biomasse, comme certains PE ou PET bio-sourcés et les plastiques

bio-dégradables comme le Polybutylène adipate terephthalate (PBAT) qui sont pétro-sourcés (European Bioplastics, 2016). Il est important de noter qu'un plastique bio-sourcé peut être bio-dégradable ou non et que le caractère de biodégradabilité dépend uniquement de la structure chimique du plastique (European Bioplastics, 2016). La production de ces bioplastiques est aujourd'hui faible : 2,05 millions de tonnes produites en 2017 (European Bioplastics, 2017).

Après son utilisation à usage unique ou non, l'objet plastique devient caduque et peut être recyclé, incinéré pour produire de l'énergie, placé en décharge ou jeté hors des flux de déchets officiels pour se retrouver *in fine* dans l'environnement. En 2016, en Europe, 27,1 millions de tonnes de plastiques se trouvaient dans les flux de déchets officiels dont 27,3% se trouvaient en décharge, 31,1% étaient recyclées et 41,6% étaient incinérées (PlasticsEurope, 2018). Concernant les emballages plus spécifiquement, en 2013 sur les 78 millions de tonnes mondialement produites, 40% se trouvaient en décharge, 14% étaient collectés pour recyclage, 14% étaient incinérés et les 32% restantes sortaient des flux des déchets, polluant ainsi l'environnement (World Economic Forum, 2016). De manière cumulative et entre 1950 et 2015 sur une production totale de 8,3 milliards de tonnes de plastiques, il a été estimé que 4,9 milliard de tonnes (60%) de cette production se sont retrouvées en décharge, 600 millions de tonnes (9%) de plastiques ont été recyclées et 800 millions de tonnes (12%) de plastiques ont été incinérées (Geyer *et al.*, 2017). En Europe, entre 2006 et 2016, la part du recyclage a augmenté de 79% passant de 4,7 à 8,4 millions de tonnes (PlasticsEurope, 2018). De manière globale, les déchets plastiques suivent les flux officiels de fin de vie avec néanmoins une partie qui termine dans l'environnement. Il est tout de même important de signaler que les proportions de déchets plastiques en décharge, incinérées ou recyclées, sont très dépendantes du pays considéré (Hopewell *et al.*, 2009). En effet, il a été estimé qu'en 2010 seulement cinq pays (Chine, Indonésie, Philippines, Vietnam et Sri Lanka) sur 192 étaient responsables de 50% des déchets plastiques terminant leurs vies dans l'environnement (Jambeck *et al.*, 2015). De plus, il a été estimé qu'entre 1,15 et 2,41 millions (min – max) de déchets plastiques pénètrent chaque année dans l'environnement marin via les rivières (Lebreton *et al.*, 2017).

I.2 Microplastiques

I.2.1 Définitions

Les particules plastiques retrouvées dans l'environnement marin couvrent une très large gamme de tailles. La première référence à des particules de plastique de tailles millimétriques

correspond à la découverte de « pellets » aussi appelés granulés pour l'industrie (GPI) dans les eaux côtières de Nouvelle-Angleterre en 1972 (Carpenter *et al.*, 1972). Cependant la première utilisation du terme « microplastique » (MP) n'apparaît que longtemps après, en 1990, définissant les particules de plastiques de tailles inférieures à 20 mm (Ryan et Moloney, 1990). Puis en 2004, les microplastiques ont été définis comme des particules millimétriques et submillimétriques (Thompson *et al.*, 2004). Néanmoins, pendant plusieurs années après la publication par Thompson *et al.* (2004) aucune définition claire des limites hautes et basses des microplastiques n'a été donnée, laissant chaque équipe de recherche utiliser sa propre définition des MP. En 2009, un groupe de travail de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) a défini les microplastiques comme étant des particules de plastiques de tailles inférieures à 5 mm sans donner de limite de taille basse (Arthur *et al.*, 2009). Il faut être vigilant car certains auteurs définissent encore aujourd'hui ces particules avec une taille inférieure à 1 mm (Browne *et al.*, 2011; Claessens *et al.*, 2011; Karami *et al.*, 2017c; Wright et Kelly, 2017), ce qui correspond à la définition du préfixe « micro- » du système international des unités. Concernant la limite basse des MP, taille à partir de laquelle le terme nanoplastique s'applique, elle n'est pas non plus clairement définie. En effet, en fonction des auteurs, il en existe deux limites: 100 ou 1000 nm (GESAMP, 2017; Gigault *et al.*, 2018; Lusher *et al.*, 2017a). Il est important de considérer aussi qu'en fonction des études, la limite basse des MP va dépendre majoritairement des techniques d'échantillonnage et de préparation de ces échantillons. Dans le présent document, les MP sont définis comme des particules ayant des tailles comprises entre 0,1 et 5000 μm dans leur plus grande dimension, en accord avec la définition donnée par la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Lusher *et al.*, 2017a). Il est néanmoins essentiel de mentionner que ce concept de taille n'est actuellement pas suffisant et peut manquer de clarté (Filella, 2015). En effet, en fonction de la forme de la particule, même pour une longueur maximale équivalente, de grandes différences de poids ou de volumes vont émerger (Filella, 2015). Dans le futur, des estimations de volumes ou de poids des particules permettraient de comparer les résultats entre les études (Filella, 2015).

Les MP, en plus d'être définis par leurs tailles, sont aussi caractérisés par leurs formes et leurs couleurs. Les formes attribuées aux MP lors de leurs identifications sont souvent les 5 classes suivantes : fragments, fibres, sphères, GPI et mousses (Lusher *et al.*, 2017b). Néanmoins ceci peut varier en fonction des études. On peut aussi classer les MP en fonction de leurs sources dans l'environnement : primaires ou secondaires.

I.2.2 Sources des microplastiques dans l'environnement marin

I.2.2.1 Sources primaires de microplastiques

Les MP d'origine primaire sont des particules plastiques fabriquées directement avec des tailles inférieures à 5 mm. Ils incluent : (i) les GPI utilisés pour la fabrication de plus grandes pièces plastiques (Figure 4A) (Barnes *et al.*, 2009; Cole *et al.*, 2011), (ii) les microbilles retrouvées dans les produits cosmétiques et d'entretiens (Figure 4B) (Chang, 2015; Fendall et Sewell, 2009; Napper *et al.*, 2015; Zitko et Hanlon, 1991) et (iii) les microbilles utilisées comme abrasifs industriels (Gregory, 1996; Lusher *et al.*, 2017a).

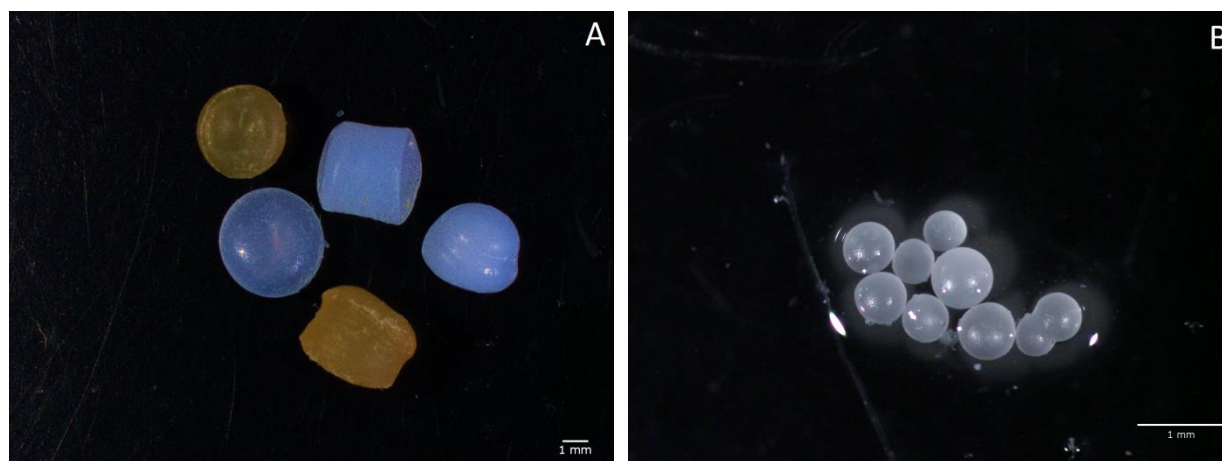


Figure 4 : Granulés pour l'industrie (GPI) récoltés sur la plage d'Equihen (62) (A) et microbilles de Polyéthylène retrouvées dans un produit cosmétique (B).

Les GPI se retrouvent dans l'environnement de manière non-intentionnelle suite à des problèmes lors du transport ou du stockage (Gregory, 1978). De nos jours, les microbilles plastiques dans les produits cosmétiques remplacent les particules naturelles comme par exemple des morceaux de noix ou de noyaux d'abricots utilisés auparavant (Gregory, 1996). Dans une étude, sur quatre marques cosmétiques retrouvées en supermarchés, Fendall et Sewell (2009) ont montré que les MP retrouvés dans ces produits sont majoritairement des fragments ou des billes de PE de tailles médianes comprises entre 196 et 375 μm . Dans une étude plus récente, des auteurs ont montré qu'entre 4 594 et 94 500 particules de PE (164 – 327 μm) pouvaient être libérées lors d'une seule utilisation ($\approx 5 \text{ mL}$) d'un produit cosmétique sous forme liquide (Napper *et al.*, 2015). De plus, depuis quelques années, la sensibilisation du grand public aux problèmes des microplastiques présents dans les produits ménagers et cosmétiques a eu pour conséquence une prise de conscience de l'industrie : certaines grandes marques et pays ont pour objectif de diminuer ou d'interdire l'utilisation de ces particules (Rochman *et al.*, 2015a). Il existe, néanmoins, encore à ce jour un débat autour des risques

posés par ces microbilles provenant des cosmétiques (Burton, 2017; Hale, 2018). Malgré tout, en France, depuis le 1^{er} janvier 2018, les particules plastiques sont interdites dans les produits cosmétiques (Legifrance, 2017).

Le cas des fibres textiles obtenues après passage en machine à laver est, dans le présent document, considéré comme une source primaire de MP dans l'environnement. Il faut ici noter que ces fibres peuvent être considérées d'origine primaire ou secondaire selon les auteurs (Salvador Cesa *et al.*, 2017). Même si, ces fibres proviennent de la dégradation de vêtements synthétiques après passage en machine à laver (Salvador Cesa *et al.*, 2017), elles ne suivent pas le même processus que pour des plastiques se fragmentant dans l'environnement (terrestre et marin). Ici, c'est l'action de laver ces vêtements synthétiques qui va produire les fibres de tailles microscopiques. En 2011, Browne *et al.* (2011) ont montré qu'un seul vêtement synthétique peut générer plus de 1900 fibres par lavage en machine. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence que le nombre de fibres produites par machine diffère significativement en fonction du type de tissus considéré. Un tissu en acrylique peut produire jusqu'à 729 000 fibres par lavage contre 138 000 et 496 000 fibres par lavage pour des tissus en polyester-coton et en polyester seul (Napper et Thompson, 2016). Une fois ces micro-fibres produites par les machines à laver, le système de collecte des eaux usées les mène jusqu'au système de traitement de ces eaux : les stations d'épurations.

Les stations d'épurations (STEP) déversent leurs effluents directement dans les cours d'eaux ou les mers sans utiliser de procédé particulier de filtration des MP. Du fait de leur petite taille, les MP peuvent être retenus ou non par les STEP et donc être libérés dans l'environnement (Carr *et al.*, 2016; Dris *et al.*, 2015; Leslie *et al.*, 2017; Mason *et al.*, 2016; Michielssen *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2016; van Wezel *et al.*, 2016). Plusieurs études ont mis en évidence que les microbilles provenant des cosmétiques sont éliminées lors du traitement primaire des STEP (Michielssen *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2016) alors que les fibres synthétiques sont majoritairement libérées dans les effluents de sortie de STEP (Mason *et al.*, 2016; Michielssen *et al.*, 2016; Mintenig *et al.*, 2017; Ziajahromi *et al.*, 2017b). Cela peut représenter entre 460 (Ziajahromi *et al.*, 2017b) et 5 000 millions de particules déversées par jour (Mintenig *et al.*, 2017). Dans une étude réalisée dans une STEP de région parisienne, il a été mis en évidence que chaque étape du traitement des effluents liquides diminue la concentration en MP, majoritairement des fibres, et qu'entre 83 et 95% des MP sont éliminés, surtout ceux ayant des tailles supérieures à 1 mm (Dris *et al.*, 2015). Dans une étude similaire réalisée aux Pays-Bas, la concentration en fibres, fragments et sphères a aussi été diminuée ($72 \pm 61\%$ (écart-type)) entre l'entrée et la sortie de la STEP mais les auteurs ont montré qu'il

y a tout de même 650 MP/kg de boues en sortie de STEP (Leslie *et al.*, 2017). Récemment, il a été estimé qu'entre 63 000 et 430 000 tonnes de MP sont déversés sur les sols européens via les boues d'épuration (Nizzetto *et al.*, 2016). De plus, comme ces boues d'épuration sont utilisées pour fertiliser les sols en agriculture, les auteurs suggèrent qu'une pollution des milieux terrestres et le ruissellement de ces MP crée une nouvelle voie de contamination du milieu marin (Leslie *et al.*, 2017; Michielssen *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2016).

Une autre source de MP dans l'environnement, qui peut être considérée comme primaire, est le dépôt atmosphérique de fibres synthétiques (Dris *et al.*, 2016; Dris *et al.*, 2015). En effet, il a été montré que les retombées atmosphériques contribuent à l'apport d'entre 2 et 355 particules/m²/j en région parisienne dont 29% des fibres retrouvées sont d'origines synthétiques.

1.2.2.2 Sources secondaires de microplastiques

Les MP d'origine secondaire sont des particules issues de la fragmentation des plastiques. Ceci inclue les déchets plastiques provenant des activités terrestres ainsi que les plastiques liés aux activités de pêche et d'aquaculture (Ryan *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2006). Les activités terrestres sont responsables de 80% des apports de plastiques dans l'environnement marin (Andrady, 2011).

La dégradation des plastiques correspond à la modification des propriétés des polymères engendrée par des mécanismes physiques, des réactions chimiques ou biologiques conduisant à la scission des liaisons chimiques (Singh et Sharma, 2008). Cette dégradation se traduit par la présence de fissures et de craquelures accompagnées d'une décoloration des polymères (Singh et Sharma, 2008) pouvant conduire à la fragmentation en plus petites particules. Il existe plusieurs types de dégradation des plastiques dont la principale en environnement marin est la photo-dégradation (Barnes *et al.*, 2009). Les rayonnements ultra-violet (UV) vont favoriser l'oxydation des chaînes polymériques au niveau des liaisons C-H et C-C formant ainsi des radicaux libres (Singh et Sharma, 2008). Ces radicaux libres vont ensuite réagir avec l'oxygène pour former des radicaux hydroperoxydes. Ces radicaux hyperoxydes en se propageant vont ensuite conduire à l'autooxydation de la chaîne polymérique menant à sa destruction (Singh et Sharma, 2008). La vitesse de photo-dégradation par les UV dépend de la nature du polymère, c'est à dire sa composition monomérique et la présence d'additif(s), ainsi que du milieu dans lequel il se trouve. En effet, la photo-dégradation des plastiques est plus rapide sur les plages où les UV en combinaison avec la chaleur et l'abrasion mécanique par les grains de sable agissent en synergie. Contrairement à la dégradation sur les plages, ce

phénomène à la surface de l'eau ou en profondeur est moins rapide car les rayonnements UV diminuent dans l'eau avec la profondeur (GESAMP, 2017). Il existe, en plus de la photodégradation, d'autres processus qui sont à l'origine de la dégradation des polymères plastiques en milieu marin. On retrouve la dégradation liée aux bactéries (Yoshida *et al.*, 2016), la fragmentation liée à certains organismes, comme par exemple le krill d'Antarctique (Dawson *et al.*, 2018) et les « stress » mécaniques (vagues, abrasion, vent ...) (Andrady, 2011; Lambert *et Wagner*, 2016a; ter Halle *et al.*, 2016; Weinstein *et al.*, 2016).

La Figure 5 présente les différentes sources de MP (primaires et secondaires) retrouvées dans l'environnement marin.

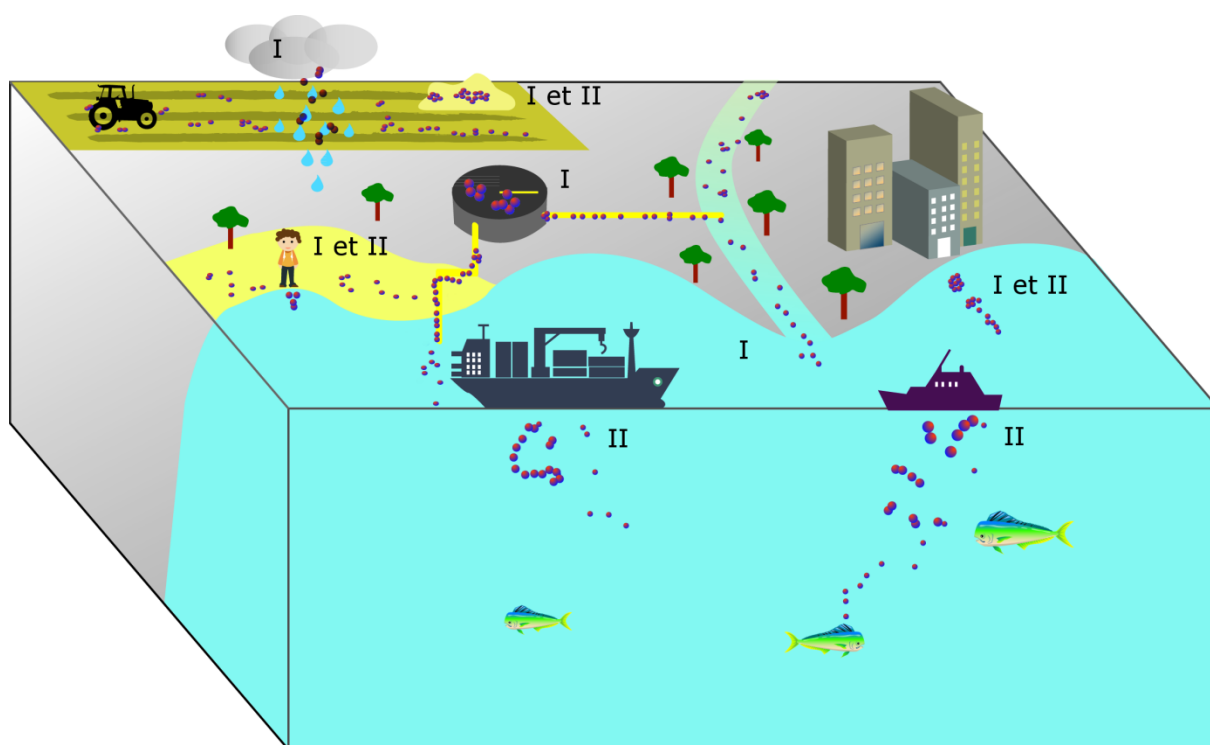


Figure 5 : Schéma représentant les sources primaires et secondaires des microplastiques dans l'environnement marin. I correspond à des sources primaires et II à des sources secondaires de microplastiques.

1.2.3 Pollution des environnements marins par les microplastiques

La présence de déchets plastiques, incluant les microplastiques, dans les océans et mers du globe est largement documentée (Lusher, 2015). Les MP sont observés dans les sédiments (Claessens *et al.*, 2011; Corcoran *et al.*, 2009; Dekiff *et al.*, 2014; Fok et Cheung, 2015), à la surface des océans (do Sul et Costa, 2014), dans la colonne d'eau (Ng et Obbard, 2006; Reisser *et al.*, 2015), dans les environnements profonds (Fischer *et al.*, 2015; Galgani *et al.*, 1996; Van Cauwenberghes *et al.*, 2013; Woodall *et al.*, 2014). Même les régions reculées de

toutes activités humaines, comme l'Arctique (Lusher *et al.*, 2015a; Obbard *et al.*, 2014) et l'Antarctique (Waller *et al.*, 2017) sont contaminées par les MP.

A l'échelle mondiale, plusieurs études ont modélisé le nombre de plastiques présents à la surface des océans en couplant les données de dénombrement des plastiques avec des modèles de circulations océaniques (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015). Ces différentes modélisations ont estimé la présence de $5,25 \cdot 10^{12}$ à $51 \cdot 10^{12}$ de particules de déchets plastiques à la surface des océans, pesant de 35 000 à 270 000 tonnes (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015). De plus, Eriksen *et al.* (2014) ont calculé que les microplastiques pouvaient représenter 92,4% des $5,25 \cdot 10^{12}$ des déchets plastiques présents à la surface des océans alors que l'étude de van Sebille *et al.* (2015) a estimé que $51 \cdot 10^{12}$ de particules de MP sont présentes à la surface des océans. Néanmoins, ces estimations ne représentaient qu'environ 1% des déchets plastiques entrant dans les océans en 2010 (Jambeck *et al.*, 2015). Cette différence peut s'expliquer par le rôle des phénomènes de photo-dégradation, de biodégradation, de sédimentation, d'ingestion par les organismes et d'échouage des particules sur le littoral (Eriksen *et al.*, 2014) qui ne sont pas pris en compte dans certains modèles. Ces études de modélisations (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015) mettent en évidence que ces déchets plastiques s'accumulent dans les zones de convergences des courants marins : les gyres (Figure 6).

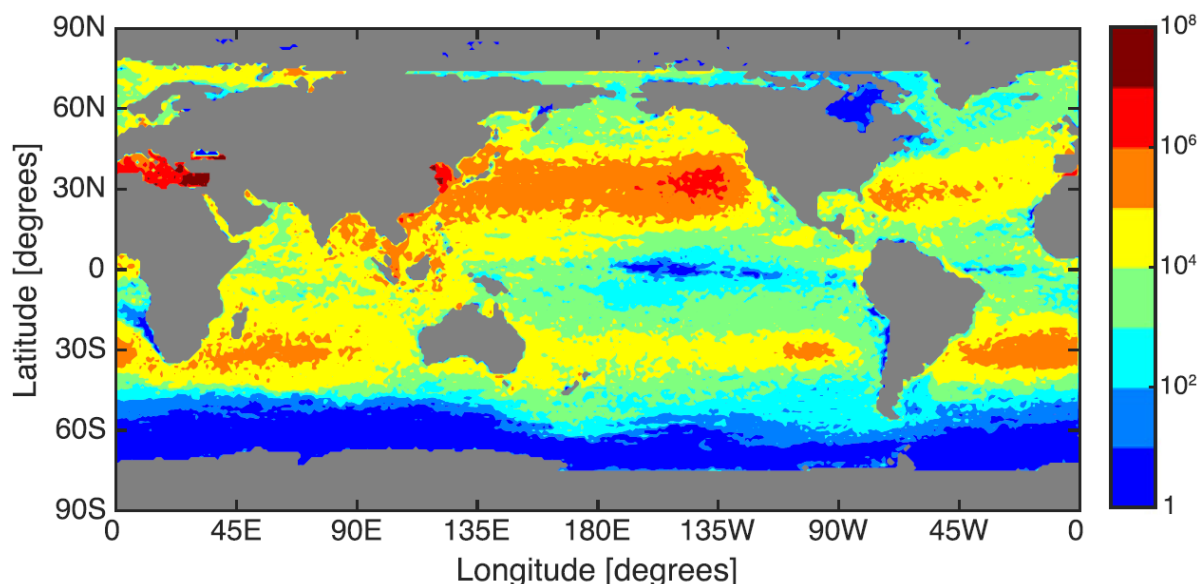


Figure 6 : Estimation de la densité de microplastiques (item/km²) à la surface des océans. D'après van Sebille *et al.* (2015).

Comme le montre la Figure 6, la mer Méditerranée est aussi une zone d'accumulation de microplastiques et plus globalement de plastiques. La densité de plastique de cette mer est du même ordre de grandeur (423 g/km² en moyenne) à ce qui est trouvé dans les gyres océaniques (281 à 639 g/km² de plastique) (Cózar *et al.*, 2015).

La distribution des MP dans les environnements marins est grandement influencée par leurs sources, par leurs propriétés chimiques différentes dépendantes du type de polymères, par les phénomènes physiques comme le vent, les courants ou la marée, par les phénomènes chimiques liés aux rayonnements UV ou par les phénomènes biologiques comme le biofouling ou la biodégradation (Ryan *et al.*, 2009). Le devenir de ces nombreuses particules de plastiques à la surface des océans est aujourd'hui peu connu et il dépend notamment de la densité des polymères. En effet, les polymères ayant une densité inférieure à celle de l'eau de mer ont tendance à flotter alors que ceux ayant une densité supérieure vont couler. De plus, l'incorporation des MP dans les agrégats phytoplanctoniques (Lagarde *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2015) ainsi que dans les pelotes fécales de zooplancton (Cole *et al.*, 2016) peuvent modifier le comportement de ces particules en augmentant leurs densités et en les entraînant vers le fond. Une autre voie de transfert des MP vers le fond des océans est possible via l'adhérence de macromolécules ou de microorganismes à la surface des MP (Figure 7). Ce phénomène se traduit par la formation d'une « ecocorona » (Galloway *et al.*, 2017). L'adhésion de matière organique ou de microorganismes à la surface des MP va augmenter leurs agrégation et ainsi leurs densités entraînant ces particules vers le fond (Galloway *et al.*, 2017). Les environnements profonds pourraient être considérés comme une zone d'accumulation des MP à cause des diverses modifications de leurs densités (Long *et al.*, 2015).

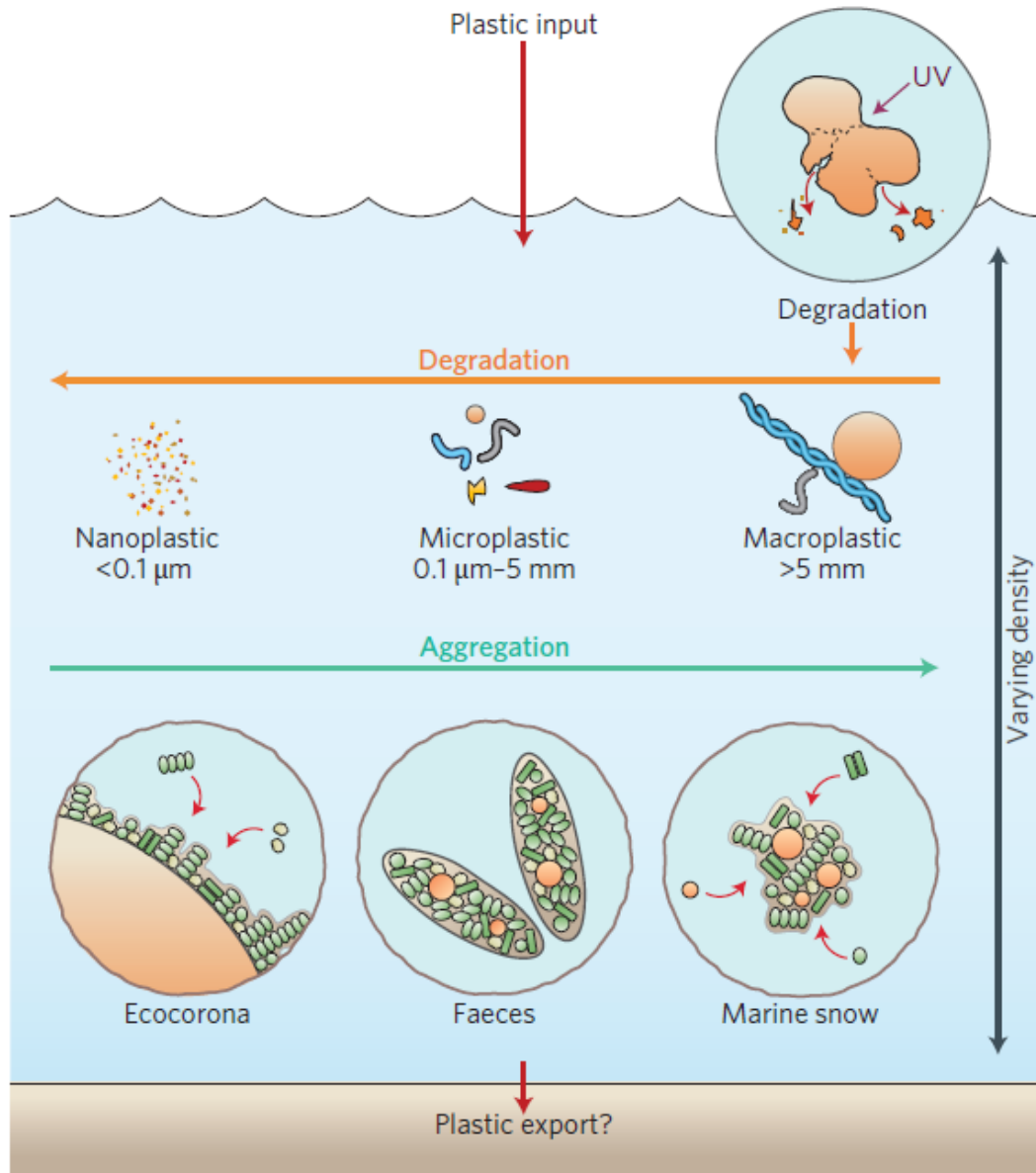


Figure 7 : Schéma représentant les changements subis par les MP dans la colonne d'eau. Ces changements, incluant l'ecocorona, l'incorporation dans les fèces et dans les neiges marines (agrégat de phytoplancton), entraînent les MP vers le fond des océans. D'après Galloway *et al.* (2017)

II Microplastiques et produits de la pêche

II.1 Ressources halieutiques

II.1.1 Production et consommation des produits de la pêche

II.1.1.1 Données mondiales

La production de la pêche mondiale est en constante augmentation depuis les années 1950 (Figure 8).

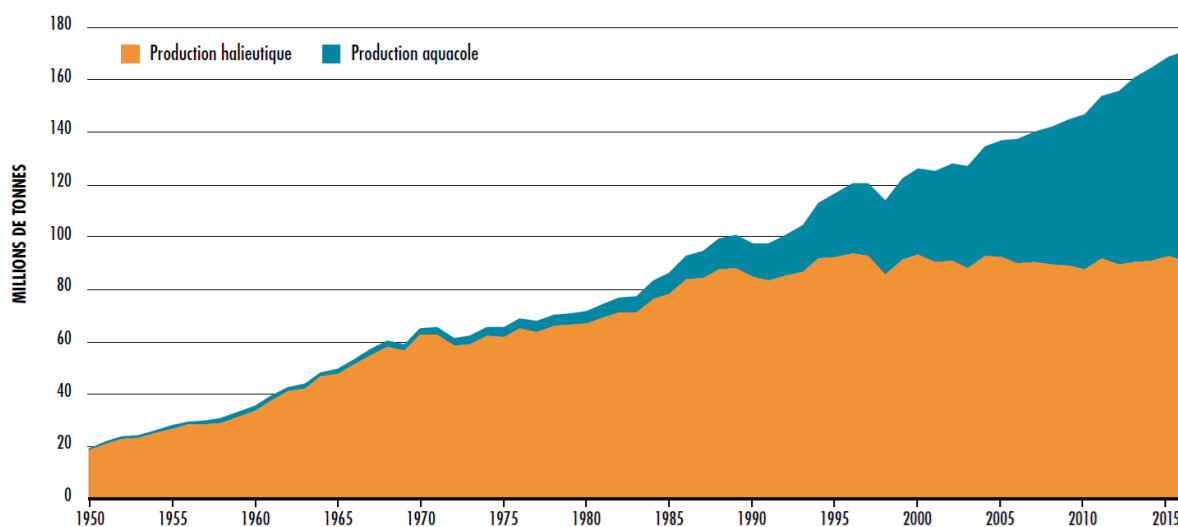


Figure 8 : Evolution de la production de la pêche mondiale (en millions de tonnes) entre 1950 et 2014. L'aire sous la courbe en orange représente la production de la pêche de capture et l'aire sous la courbe en turquoise représente la production de l'aquaculture. D'après FAO (2018a).

Pour la période 2011-2016, la production de pêche de capture est passée de 92,2 à 90,9 millions de tonnes soit une tendance à la stagnation. La tendance est plus marquée pour la production de l'aquaculture qui augmente de 61,8 à 80,0 millions de tonnes entre 2011 et 2016 soit une augmentation de 29,4% (Tableau 2). La production de l'aquaculture ne représentait que 7% de la production mondiale en 1974, passait à 25,7% en 2000 pour atteindre 46,8% de la production mondiale en 2016. De plus, la majorité de la production de pêche de capture provient du milieu marin alors que pour l'aquaculture, la production provient majoritairement du milieu continental (Tableau 2). La majorité de la production de la pêche de capture et de l'aquaculture, soit 88% en 2016, est destinée à la consommation humaine. La part de la production servant à des usages non-alimentaires est majoritairement utilisée pour produire de la farine et des huiles de poisson (FAO, 2018a).

Tableau 2 : Production de la pêche de capture et de l'aquaculture (en millions de tonnes) entre 2011 et 2016. D'après FAO (2018a)

Production	2011	2012	2013	2014*	2015*	2016*
Capture						
Continentale	10,7	11,2	11,2	11,3	11,4	11,6
Marine	81,5	78,4	79,4	79,9	81,2	79,3
Total - Capture	92,2	89,5	90,6	91,2	92,7	90,9
Aquaculture						
Continentale	38,6	42,0	44,8	46,9	48,6	51,4
Marine	23,2	24,4	25,4	26,8	27,5	27,7
Total - Aquaculture	61,8	66,4	70,2	73,7	76,1	80,0
Total	154,0	156,0	160,7	164,9	168,7	170,9

*Les données 2014-2016 sont des estimations provisoires

Pour la pêche de capture en milieu marin, les cinq principaux producteurs sont : La Chine, l'Indonésie, les Etats Unis d'Amérique (USA), la Russie et l'Inde. Ces pays représentaient 43% de la production des pêches de capture mondiale en 2016. Les zones des océans où la pêche était en augmentation entre 2015 et 2016 étaient l'Atlantique Centre-Est, l'Atlantique Centre-Ouest et la zone arctique et antarctique alors que dans les zones de l'Atlantique Sud-Ouest, le Pacifique Sud-Ouest et le Pacifique Sud-Est, les volumes de capture ont diminué entre 2015 et 2016. La diminution du volume de captures dans la zone Pacifique Sud-Est est due à une diminution du nombre de capture de l'anchois du Pérou (*Engraulis ringens*) dont la capture est grandement influencée par le phénomène El Niño. La zone de pêche la plus productive en termes de capture de poisson est la zone du Pacifique Nord-Ouest. Dans la majorité de ces zones de pêche, la présence d'une grande concentration de plastique est retrouvée aux niveaux des gyres subtropicaux (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015).

En 2016, la production aquacole a atteint un chiffre record de 80 millions de tonnes (Tableau 2) dont 54,1 millions de tonnes de poissons, 17,1 millions de tonnes de mollusques, 7,9 millions de tonnes de crustacées et 900 000 tonnes d'autres organismes aquatiques (Figure 9). L'augmentation de la production aquacole est majoritairement soutenue par l'augmentation de la production de poisson d'aquaculture (Figure 9). L'Asie est le continent qui possède la production aquacole, continentale et marine, la plus importante avec environ 71,5 millions de tonnes produites en 2016 soit 89% de la production aquacole mondiale. L'Asie est suivie de l'Amérique avec 3,3 millions de tonnes produites (4,55%) et de l'Europe avec 2,9 millions de tonnes produites (4%) en 2016.

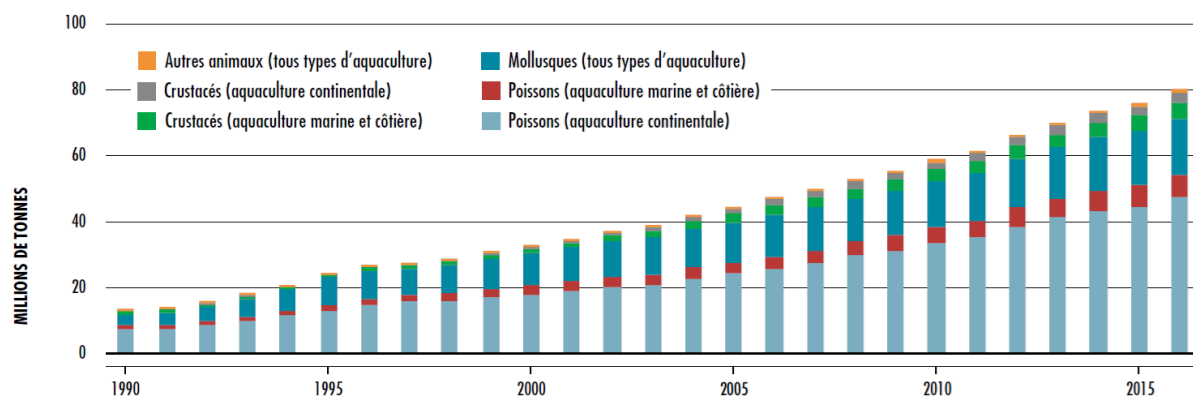


Figure 9 : Evolution de la production aquacole mondiale (en millions de tonnes) entre 1990 et 2016. Les données sont classées en fonctions des groupes d'espèces produites. D'après FAO (2018a).

A cause de leur composition et de la flore bactérienne associée, les produits de la pêche sont des denrées rapidement périssables pouvant devenir vite impropres à la consommation humaine. Afin de pallier à ce problème, il existe un certain nombre de techniques de conservation et de transformation de ces produits. Ces techniques consistent à diminuer la température du produit (congélation ou réfrigération), à le soumettre à de la chaleur (cuisson à l'eau, fumage ou mise en conserve) ou à réduire sa teneur en eau (séchage, salage ou fumage). Ces différentes techniques conduisent à une transformation du produit et donc sa vente peut se faire sous plusieurs formes. En effet, en 2016, 45% du poisson destiné à la consommation humaine était vendu vivant, frais ou réfrigéré, 31% était vendu congelé, 12% était vendu préparé et mis en conserve et 12% était vendu salé, fumé ou préparé d'une autre façon. D'une manière globale, la consommation annuelle de poisson a progressé dans les pays développés ainsi que dans les pays en développement, passant globalement de 9,9 kg dans les années 1960 à 20,5 kg consommé en moyenne par personne en 2015. Il est néanmoins important de noter que ces moyennes mondiales cachent des disparités entre continents, la consommation étant de 25 kg de poisson/an/habitant en Océanie et seulement de 9,8 kg/habitant/an en Amérique latine et dans les Caraïbes (FAO, 2018a).

II.1.1.2 Données françaises

En 2016, la France a produit 644 000 tonnes de produits de la mer d'après les données FranceAgriMer (FranceAgriMer, 2017). L'aquaculture, c'est à dire conchyliculture et pisciculture, représentait 30% de la production française en 2014. D'un point de vue de la consommation, les français ont consommé, en 2014, 34,1 kg de produits aquatiques/habitant/an dont 24,3 kg de poissons/habitant/an. Depuis la fin des années 1990, la consommation de produits de la pêche par habitant et par an était assez stable (Figure 10), avec une consommation moyenne entre 1998 et 2014 de 33,8 kg de produits

aquatiques/habitant/an. La France fait partie des pays qui consomment le plus de poisson par habitant et par an avec les pays de l'Asie du Sud-Est et de l'Asie de l'Est (Lusher *et al.*, 2017a). Il faut aussi noter que les français consomment plus de poisson que les autres produits comme les céphalopodes, les coquillages et les crustacés (Figure 10).

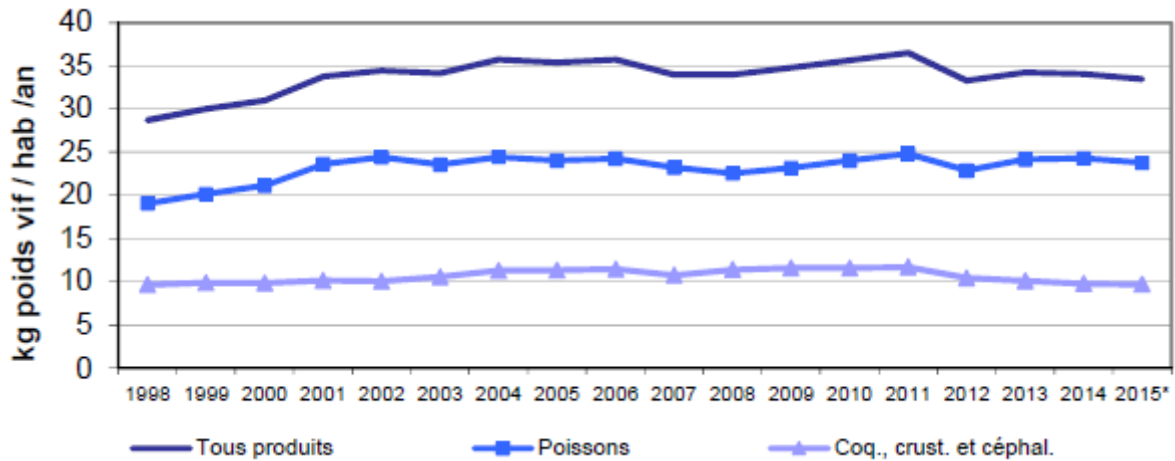


Figure 10 : Evolution de la consommation française des produits aquatiques (en kg de poids vif/habitant/an) entre 1998 et 2015. * Les données de 2015 sont des estimations. D'après FranceAgriMer (2017)

Les français achètent principalement des produits aquatiques vendus frais qui représentaient 35% des achats des ménages. Dans l'ordre, les français achètent ensuite principalement des produits traiteurs réfrigérés comprenant par exemple les tartinables, le surimi, les crevettes et gambas cuites, le poisson fumé, séché ou salé et les marinades (28%), des produits surgelés (19%) puis des conserves (18%). Considérant ces données, il apparaît que les français consomment majoritairement des produits transformés par rapport aux produits non transformés. En 2016, les espèces fraîches les plus consommées sont, en France, la moule (*Mytilus spp.*) avec 42 886 tonnes (poids vif avec coquille), l'huître (*Crassostrea gigas*) avec 25 673 tonnes (poids vif avec coquille), le cabillaud (*Gadus morhua*) avec 22 358 tonnes, le saumon (*Salmonidae*) avec 21 280 tonnes, et le lieu noir (*Pollachius virens*) avec 7 448 tonnes (FranceAgriMer, 2017).

II.1.2 Bénéfices de la consommation des produits de la pêche

La consommation de produits de la pêche est à l'origine de nombreux bénéfices. En lien avec l'augmentation de la consommation mondiale de produits de la pêche, la part de protéines animales d'origine halieutique représentait 17% des apports protéiques de la population mondiale en 2013. Le poisson est une source importante de protéines, d'acides gras essentiels (oméga 3 et 6), de vitamines (A, B et D) et de minéraux. La consommation de poisson favorise le développement du cerveau, diminue le risque de maladies

cardiovasculaires, de cancer et d'Alzheimer (Kalogeropoulos *et al.*, 2012; Maulvault *et al.*, 2013). La consommation de poisson peut donc représenter un bénéfice pour la santé du consommateur. En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) recommande de manger deux portions de poisson par semaine afin de bénéficier des qualités nutritionnelles de ce type de produit (Anses, 2013). Cette recommandation tient compte des contaminations pouvant survenir dans ce type de produits. Les produits de la pêche peuvent être contaminés par les polychlorobiphényles (PCB) et d'autres produits chimiques pouvant présenter un risque néfaste en cas de surexposition (Anses, 2013). Etant donné que les MP sont actuellement considérés comme un contaminant émergent du milieu marin, il est essentiel d'étudier la contamination des produits de la pêche par les MP afin d'évaluer le danger pour le consommateur lié à ce contaminant.

II.2 Contamination des produits de la pêche par les microplastiques

Dans le cadre de l'étude de la prévalence des MP dans les produits de la pêche, l'OSPAR ou l'Union Européenne recommandent un minimum d'individus à échantillonner de 50 pour les poissons et les invertébrés marins afin d'assurer une bonne représentativité des données (Directive Strategy Framework, 2013; OSPAR, 2015). Les études ci-dessous concernent toutes des produits de la pêche consommés par l'Homme. Aucun tri en fonction de la qualité des résultats n'a été effectué dans la présentation de ces études. Néanmoins, certaines études n'ont pas utilisé d'identification chimique des potentiels MP ou n'ont pas considérées leurs résultats au vu de la possible contamination aéroportée par des fibres.

II.2.1 Coquillages et crustacés

L'ingestion de MP a été montrée chez plusieurs espèces d'invertébrés marins (Tableau 3). Les espèces de bivalves filtreurs comme *Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*, du fait de leur mode d'alimentation, ingèrent des MP présents dans l'environnement. Il a été montré que les moules ingèrent de 0,05 à 0,37 MP/g de chair humide le long des côtes européennes (Phuong *et al.*, 2018a; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Vandermeersch *et al.*, 2015a). Néanmoins, le long des côtes chinoises, l'ingestion de MP varie de 0,9 à 4,6 MP/g de chair humide, soit 1,5 à 7,6 MP/individu, ce qui est bien supérieur au niveau de contamination européen (Li *et al.*, 2018a; Li *et al.*, 2016b). De plus, Li *et al.* (2016b) ont mis en évidence une présence de MP significativement plus importante pour les moules sauvages (4,6 MP/individu – 2,7 MP/g de chair humide) en comparaison aux moules d'aquaculture (3,3 MP/individu – 1,6 MP/g de chair humide) (p-value<0,01 – Test T) ainsi qu'une ingestion de MP plus importante en zones anthropisées (3,3 MP/g de chair

humide) (Li *et al.*, 2016b). Le même type de résultats a été trouvé concernant la contamination en MP plus importante pour des moules d'aquaculture (Mathalon et Hill, 2014). Néanmoins, l'étude de Mathalon et Hill (2014) présente quelques biais analytiques et une potentielle contamination des échantillons avec des fibres provenant de l'environnement du laboratoire. Dans un travail réalisé au Royaume Uni, Li *et al.* (2018c) ont montré une différence de contamination aux MP entre des moules sauvages et des moules achetées dans des supermarchés. Les moules de supermarchés contenaient moins de MP/g de chair (0,9 à 1,4 MP/g de chair) que les moules sauvages (0,7 à 2,9 MP/g de chair) ($p < 0,001$ – ANOVA) sans que cette différence soit observée pour les données en MP/individu (Li *et al.*, 2018c). Il est à noter que d'autres études n'ont pas trouvé de différence de prévalence de MP entre des moules sauvages et des moules d'aquaculture (De Witte *et al.*, 2014; Phuong *et al.*, 2018a). De plus, une étude sur la contamination des moules (*M. edulis*) et des huîtres (*C. gigas*) n'a pas montré de différences d'ingestion de MP en fonction des différents sites (3 pour les moules et 2 pour les huîtres) et de la période (Automne ou Printemps) de prélèvement (Phuong *et al.*, 2018a).

Une étude sur la palourde *Venerupis philippinarum*, a mis en évidence une contamination aux MP de 100% des individus échantillonnés (Davidson et Dudas, 2016). Ce fort taux de contamination peut être expliqué par une pollution par des fibres venant de l'air ambiant lors de la préparation et de l'analyse des échantillons en laboratoire (Davidson et Dudas, 2016). Par ailleurs, ces auteurs (Davidson et Dudas, 2016) n'ont pas montré de différence significative ($p = 0,289$ – ANOVA) de présence de MP entre des palourdes d'aquaculture ($11,3 \pm 6,6$ (écart-type (S.D)) MP/individu – $1,7 \pm 1,2$ MP/g de chair) et des palourdes sauvages ($8,4 \pm 8,5$ MP/individu – $0,9 \pm 0,9$ MP/g de chair). Rochman *et al.* (2015b) ont montré que l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, était contaminée dans 33,3% des cas et contenait en moyenne 0,6 MP/individu contaminé. Une étude sur 9 espèces de bivalves commerciaux chinois a révélé la présence de 4,3 à 57,2 MP/individus soit entre 2,1 et 10,5 MP/g de chair humide (Li *et al.*, 2015) ce qui est très supérieur à la contamination retrouvée dans les bivalves européens (De Witte *et al.*, 2014; Phuong *et al.*, 2018a; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Vandermeersch *et al.*, 2015a). Ce taux de contamination des bivalves chinois par des microplastiques s'expliquent par le fait que les eaux chinoises sont très contaminées par les plastiques (Isobe *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014). De plus, les auteurs ont démontré que la contamination croisée atmosphérique était faible et n'était pas la cause de cette forte contamination des bivalves par les MP (Li *et al.*, 2015).

Une étude sur les crevettes grises le long des côtes européennes met en évidence un taux de contamination de 63% des crevettes échantillonnées (Devriese *et al.*, 2015). Concernant les langoustines, sur 120 individus échantillonnés, 83% contenaient des MP (Murray et Cowie, 2011) alors qu'une autre étude révélait un niveau de contamination de 67% sur 1450 langoustines échantillonnées (Welden et Cowie, 2016b).

A ce jour, vingt études sur vingt espèces différentes d'invertébrés marins ont été réalisées afin de caractériser la présence de MP dans ces espèces (Tableau 3). L'effort d'échantillonnage varie de 5 individus échantillonnés par site (Vandermeersch *et al.*, 2015a) à 1450 (Welden et Cowie, 2016b) et la contamination varie de 0,05 MP/g de chair humide pour des moules (*M. galloprovincialis*) échantillonnées dans l'estuaire du Po en Italie (Vandermeersch *et al.*, 2015a) à 10,5 MP/g de chair humide pour des bivalves échantillonnés sur les côtes Chinoises (Li *et al.*, 2015).

Tableau 3 : Contamination par les microplastiques des invertébrés marins consommés par l'Homme

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre moyen de débris plastiques/individu ± S.D	Taille des plastiques (mm)	Localisation	Réf
Phylum Mollusca							
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule	100	-	0,34 ± 0,33 p/g	-	Estuaire du Tagues, Portugal	[9]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule	100	-	0,05 ± 0,11 p/g	-	Estuaire Po, Italie	[9]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule	25	-	0,15 ± 0,33 p/g	-	Baie de Fangar, Espagne	[9]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^b	Moule	25	-	0,25 ± 0,26 p/g	-	Coro, Italie	[9]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^b	Moule	100	-	0,04 ± 0,09 p/g	-	Ebro delta, Espagne	[9]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^b	Moule	18	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g)	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^c	Moule	80	46,3	1,9 ± 0,2	<0,1 – 1	Mer Ionienne, Grèce	[22]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	25	-	0,06 ± 0,13 p/g	-	Baie de Saint Brieuç, France	[9]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	25	-	0,32 ± 0,22 p/g	-	Inschot, Pays-Bas	[9]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	36	-	0,36 ± 0,07 p/g	5 - 25 µm	Mer du Nord, Allemagne	[7]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	-	-	0,2 ± 0,3 p/g	20 -90 µm	Mer du Nord	[8]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	45	-	0,37 p/g	Fibres : 0,3 - 1	Mer du Nord, Belgique	[3]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	390	-	1,5 – 7,6 (0,9 – 4,6 p/g)	Fibres : 0,033 – 4,7	Côtes chinoises, Chine	[10]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	-	97	1,05 – 4,44 p/g	0,2 – 10,67	Oban, Ecosse	[15]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	120	-	0,60 ± 0,56 (0,23 ± 0,20 p/g)	52% 50-100 µm, 37% 20-50 µm et 11% >100 µm	Côtes Atlantique, France	[16]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	162	100	1,1 – 6,4 (0,7 – 2,9 p/g)	8 µm – 4,7 mm	Côtes du Royaume Uni	[18]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule	30	100	106 – 126	-	Côtes de Nouvelle-Ecosse, Canada	[23]
<i>Mytilus edulis</i>	Moule (aquaculture)	15	100	178	-	Côtes du Labrador, Canada	[23]
<i>Mytilus trossulus</i>	Moule	450	-	0,04 ± 0,19 (0,26 ± 1,3 p/g)	-	Sortie de STEP, Mer Baltique	[21]
<i>Crassostrea gigas</i>	Huître creuse	11	-	0,47 ± 0,16 p/g	5 - 25 µm	Océan Atlantique	[7]
<i>Crassostrea gigas</i> ^b	Huître creuse	12	33,3	0,6 ± 0,9 (2,10 ± 1,71 p/g)	5,5 ± 5,8	Océan Pacifique	[6]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre moyen de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm)	Localisation	Réf
<i>Crassostrea gigas</i>	Huître creuse	60	-	2,10 \pm 1,71 (0,18 \pm 0,16 p/g)	52% 50-100 μ m, 37% 20-50 μ m et 11% >100 μ m	Côtes Atlantique, France	[16]
<i>Saccostrea cucullata</i>	Huître	330	100	1,7 – 4,0 (1,5 – 7,2 p/g)	75,6 – 89,7% <100 μ m	Estuaire de la rivière des Perles, Chine	[17]
<i>Dosidicus gigas</i>	Encornet géant	30	26,7	Max : 11	Pellet : 3-5	Colombie britannique, Canada	[1]
<i>Perna perna</i>	Moule	30	75	-	-	Estuaire de Santos, Brésil	[5]
<i>Venerupis philippinarum</i>	Palourde japonaise (sauvage)	27	100	8,4 \pm 8,5 (0,9 \pm 0,9 p/g)	-	Colombie britannique, Canada	[11]
<i>Venerupis philippinarum</i>	Palourde japonaise (aquaculture)	27	100	11,3 \pm 6,6 (1,7 \pm 1,2 p/g)	-	Colombie britannique, Canada	[11]
<i>Venerupis philippinarum</i> ^b	Palourde japonaise	24	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Scapharca subcrenata</i> ^b		6	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Tegillarca granosa</i> ^b		18	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Patinopecten yessoensis</i> ^b		6	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Alectryonella plicatula</i> ^b		18	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Sinonovacula constricta</i> ^b		6	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Meretrix lusoria</i>		18	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
<i>Cyclina sinensis</i>		30	-	4,3 – 57,2 (2,1 – 10,5 p/g) ^d	0,05 - 5	Côtes chinoises, Chine	[12]
Phylum Crustacean							
<i>Nephros norvegicus</i>	Langoustine	120	83	-	-	Clyde, Angleterre	[4]
<i>Nephros norvegicus</i>	Langoustine	1450	67	-	-	Côtes Ecossoises	[13]
<i>Crangon Crangon</i> ^a	Crevette grise	150	63	0,65 \pm 0,30	0,2 - 1	Belgique, Mer du Nord	[2]
<i>Crangon Crangon</i> ^a	Crevette grise	5	63	1,76 \pm 1,64	0,2 - 1	Angleterre, Mer du Nord	[2]
<i>Crangon Crangon</i> ^a	Crevette grise	5	63	1,21 \pm 1,75	0,2 - 1	France, Manche	[2]
<i>Crangon Crangon</i> ^a	Crevette grise	5	63	0,40 \pm 0,56	0,2 - 1	Pays-Bas, Mer du Nord	[2]
<i>Aristeus antennatus</i>	Crevette rouge	148	39,2	-	1,9 – 26,7	Mer Méditerranée, Espagne	[19]
<i>Eirocheir sinensis</i>	Crabe chinois	302	13		0,5 - 5	Estuaire du Tage, Portugal et Mer Baltique, Pologne	[14]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre moyen de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm)	Localisation	Réf
<i>Maja Squinado</i>	Araignée de mer	54	42,5	1,39 \pm 0,79	> 0,5	Mer de Clyde, Angleterre	[20]

^a Indique le pourcentage moyen sur l'ensemble des individus échantillonné ; ^b Indique des individus échantillonnés sur des marchés ; ^c : digestion glande digestive et branchies seulement ; ^d données concernant l'ensemble des espèces de l'étude

- : indique une absence de données ; p/g : particule/g de chair humide

Références bibliographique : [1] Braid *et al.* (2011) ; [2] Devriese *et al.* (2015) ; [3] De Witte *et al.* (2014) [4] Murray et Cowie (2011) ; [5] Santana *et al.* (2016) [6] Rochman *et al.* (2015b) ; [7] Van Cauwenberghe et Janssen (2014) ; [8] Van Cauwenberghe *et al.* (2015) ; [9] Vandermeersch *et al.* (2015a) ; [10] Li *et al.* (2016b) ; [11] Davidson et Dudas (2016) ; [12] Li *et al.* (2015) ; [13] Welden et Cowie (2016b) ; [14] Wójcik-Fudalewska *et al.* (2016) ; [15] Courtene-Jones *et al.* (2017) ; [16] Phuong *et al.* (2018a) ; [17] Li *et al.* (2018a) ; [18] Li *et al.* (2018c) ; [19] Carreras-Colom *et al.* (2018) ; [20] Welden *et al.* (2018) ; [21] Railo *et al.* (2018) ; [22] Digka *et al.* (2018) ; [23] Mathalon et Hill (2014)

II.2.2 Poissons frais

La présence de plastiques dans les tractus gastro-intestinaux (TGI) chez les poissons, comprenant les actinoptérygiens et les chondrichthyens, a été montrée dans toutes les mers et les océans (Tableau 4). En 1972, [Carpenter *et al.* \(1972\)](#) a mis en évidence pour la première fois l'ingestion de MP chez des poissons pêchés aux larges des Etats-Unis. Dans les années 70, d'autres études ont démontré l'ingestion des MP chez des poissons aux larges du Royaume-Uni ([Kartar *et al.*, 1973](#); [Kartar *et al.*, 1976](#)).

Tous les types de poissons, pélagiques, démersaux et benthiques, sont contaminés. Des études montrent l'ingestion de MP par des espèces de poissons méso-pélagiques dans le gyre Nord Pacifique ([Boerger *et al.*, 2010](#); [Choy et Drazen, 2013](#); [Davison et Asch, 2011](#)) ainsi que dans l'océan Atlantique Nord-Est ([Lusher *et al.*, 2015b](#)). De plus, chez des espèces de poissons méso-pélagiques de l'Atlantique Nord-Est, [Lusher *et al.* \(2015b\)](#) n'ont pas mis en évidence de différence d'ingestion de plastique en fonction de l'espèce étudiée, du comportement de migration verticale : absence ou présence de migration et de l'heure de capture : en journée ou la nuit.

Par ailleurs, la contamination des TGI par des plastiques a été décrite aussi chez des poissons estuariens du Brésil ([Dantas *et al.*, 2012](#); [Possatto *et al.*, 2011](#); [Ramos *et al.*, 2012](#)). L'ingestion de MP chez les espèces estuariennes peut intervenir aux différents stades de vie ([Dantas *et al.*, 2012](#); [Possatto *et al.*, 2011](#)).

De même pour les zones côtières, une étude comparative sur sept espèces (*Gadus morhua*, *Merlangius merlangus*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Clupea harengus*, *Trachurus trachurus*, *Eutrigla gurnardus* et *Scomber scombrus*) de la mer du Nord et la mer Baltique, a montré une différence d'ingestion entre ces deux zones géographiques ([Foekema *et al.*, 2013](#)). Les poissons de la mer Baltique ingèrent en moyenne plus de MP (5,4%) que les poissons de la mer du Nord (1,2%) ([Foekema *et al.*, 2013](#)). Une autre étude concernant dix espèces de poissons de la Manche montre une ingestion de MP pour 37% des 504 poissons échantillonnés ([Lusher *et al.*, 2013](#)). Aucune différence d'ingestion de MP n'a été mise en évidence entre les espèces pélagiques (*M. merlangus*, *Micromeditius poutassou*, *T. trachurus*, *Trisoperus minutus* et *Zeus faber*) et benthiques (*Aspitrigla cuculus*, *Callionymus lyra*, *Cepola macrophthalma*, *Buglossisium luteum* et *Microchirus variegates*) ([Lusher *et al.*, 2013](#)). Dans les eaux écossaises, Mer du Nord et Océan Atlantique, l'ingestion de macro- et microplastiques a été observée chez cinq espèces de poissons (*Pleuronectes platessa*, *Platichthys flesus*, *Limanda limanda*, *Lepidorhombus whiffiagonis* et *Argentina silus*) ([Murphy *et al.*, 2017](#)). Dans cette étude, il a été démontré que les espèces vivantes en zones

côtières ainsi que les espèces démersales ingèrent significativement plus de débris de plastique (Test U de Mann-Whitney, $p < 0,001$) que les espèces du large et pélagiques (Murphy *et al.*, 2017). Une étude au large du Portugal a montré une ingestion de MP chez 19,8% des poissons échantillonnés avec la présence de fibres et de fragments dans 65,8% et 34,2% des cas, respectivement (Neves *et al.*, 2015). En mer Méditerranée, l'ingestion de plastiques a aussi été montrée pour plusieurs espèces de poissons pélagiques (Anastasopoulou *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2015). La présence de MP a aussi été mise en évidence chez des poissons directement obtenus sur des marchés locaux en Indonésie et en Californie (Rochman *et al.*, 2015b).

Actuellement, il est difficile d'établir un lien clair entre la position du poisson dans la colonne d'eau et la quantité ingérée de MP. En effet, chaque étude trouve des résultats différents des autres même lors d'études portant sur des espèces identiques.

Les 34 différentes études sur l'ingestion des MP chez les 122 espèces de poissons révèlent des taux de contamination par ces particules, dans les tubes digestifs, allant de 2 à 100% (Lusher, 2015). Cependant, il est important de noter que les études mettant en évidence des taux d'ingestion de 100% ont été effectuées sur un faible nombre d'échantillons (Avio *et al.*, 2015a; Carpenter *et al.*, 1972; Davison et Asch, 2011; Neves *et al.*, 2015). En fonction des études considérées, l'effort d'échantillonnage est très variable allant de 1 individu (Lusher *et al.*, 2015b) à 1090 individus échantillonnés par espèce (Kartar *et al.*, 1976). Il est primordial d'effectuer ces recherches de MP sur un grand nombre d'individus afin d'avoir une analyse plus fine et plus représentative de la contamination. Comme dit précédemment, l'OSPAR ou l'Union Européenne préconisent un minimum de 50 individus à échantillonner par espèce pour les poissons et les invertébrés marins (Directive Strategy Framework, 2013; OSPAR, 2015). De plus, il est important de noter que seulement 47% (16 études) des 34 études ci-dessous ont utilisé des techniques d'identification de polymère sur une partie ou sur l'ensemble des MP-like retrouvés dans les TGI des poissons. De manière générale, les études trouvant beaucoup de fibres sans vérifier le caractère synthétique ou non de celles-ci ont détecté plus de « MP » dans leurs échantillons. A ce jour, une étude ayant été réalisée sur plusieurs espèces de poissons de la mer du Nord a montré qu'en utilisant de bonnes pratiques de laboratoire suivi d'une identification, le nombre total de MP trouvés dans les TGI était faible : 2 MP sur l'ensemble des 400 poissons échantillonnés (Hermsen *et al.*, 2017).

Tableau 4 : Contamination des tractus gastro-intestinaux par les microplastiques des espèces du milieu naturel d'Elasmobranches consommés par l'Homme.

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Class Actinopterygii</i>							
<i>Order Anguiliformes</i>							
<i>Nemichthys scolopaceus</i>		1	100	1	0,5 – 11,7	Océan Atlantique	[21]
<i>Order Atheriniformes</i>							
<i>Menidia menidia</i>		9	33	-	0,1 – 3	New England (USA)	[4]
<i>Atherinopsis californiensis*</i>		7	29	1,6 \pm 3,7	> 0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Order Aulopiformes</i>							
<i>Alepisaurus ferox</i>		144	30	2,7 \pm 2,0	68,3 \pm 91,1	Pacifique Nord	[5]
<i>Alepisaurus ferox</i>		192	24,5	1 – 50	73,9 \pm 111,1	Pacifique Nord	[9]
<i>Arctozenus risso</i>		14	21	0,29	0,5 – 11,7	Océan Atlantique	[21]
<i>Order Argentiniformes</i>							
<i>Xenodermichthys copei</i>		5	60	1,2	0,5 – 11,7	Océan Atlantique	[21]
<i>Order Beloniformes</i>							
<i>Cololabis saira</i>		54	35 [#]	3,2 \pm 3,05	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Order Clupeiformes</i>							
<i>Clupea harengus</i>	Hareng	2	100	1	0,1 – 3	New England (USA)	[4]
<i>Clupea harengus</i>	Hareng	566	2	1 – 4	0,5 - 3	Mer du Nord	[8]
<i>Clupea harengus</i>	Hareng	20	50	Total : 15	0,13 – 3,9	Manche	[28]
<i>Clupea harengus</i>	Hareng	131	0	0	0	Mer du Nord	[30]
<i>Stolephorus commersonii</i>		16	37,5		1,14 - 2,5	Alappuzha, Inde	[12]
<i>Alosa fallax</i>		1	100	1	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Engraulis mordax</i>	Anchois du pacifique	10	30	0,3 \pm 0,5	> 0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine	99	19	1,78 \pm 0,7	0,21 \pm 0,20	Mer Adriatique	[2]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine	30	45	Total : 11	0,25 – 9,5	Manche	[28]
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine	36	47,2	0,8 \pm 0,2 (S.E)	< 0,1 – 1mm	Mer Ionienne, Grèce	[36]
<i>Spratelloides gracilis</i> *	Hareng	10	40	1,1 \pm 1,7	> 0,5	Océan Indien	[17]
<i>Eugraulis japonicus</i>	Anchois japonais	64	77	2,3 \pm 2,5	0,78 \pm 1,02	Baie de Tokyo, Japon	[26]
<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois commun	20	40	Total : 17	0,22 – 2,9	Mer Méditerranée	[28]
<i>Sprattus sprattus</i>	Sprat	141	0,25	0,005	0,3 - 0,4	Mer du Nord	[30]
Order Gadiformes							
<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	1	100	1	0,1 – 3	New England (USA)	[4]
<i>Ciliata mustela</i>		112	0 - 10	-	1	Estuaire de la Severn, Angleterre	[10]
<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	27	51,9	2,07 (\pm 0,9)	2,0 \pm 2,4	Manche	[13]
<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	50	32	7,75 (\pm 1,4)	2,2 \pm 2,3	Manche	[13]
<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	105	6	1 – 3	1,7 \pm 1,5	Mer du Nord	[8]
<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	28	0	0	0	Mer du Nord	[30]
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Eglefin	97	6	1	0,77 \pm 0,33	Mer du Nord	[8]
<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	80	13	1 – 2	1,24 \pm 1,25	Mer du Nord	[8]
<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	74	1,4	1 – 2	0,18 – 500	Mer Baltique	[19]
<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	309	3	2 – 14	3,2 – 41, 7	Côtes Norvègiennes	[23]
<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	205	2,4	0 – 2	6,06 \pm 1,17	Terres Neuves, Canada	[25]
<i>Trisopterus minutus</i>	Capelin	50	40	1,95 \pm 1,2	2,2 \pm 2,2	Manche	[13]
<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu européen	7	29	0,29 \pm 0,49	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu européen	3	100	1,33 \pm 0,57	0,21 \pm 0,20	Mer Adriatique	[2]
<i>Merluccius merluccius</i> *	Merlu européen	5	20	0,40 \pm 0,89	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu européen	12	16,7	1,56 \pm 0,5	0,38 – 3,1	Mer Méditerranée, Espagne	[22]
<i>Boreogadus saida</i>	Morue polaire	72	2,8	1	0,59 – 0,65	Océan Arctique	[33]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
Order Lampriformes							
<i>Lampris sp.</i>	Gros yeux	115	49	2,3 \pm 1,6	49,1 \pm 71,1	Pacifique Nord	[5]
<i>Lampris sp.</i>	Petits yeux	24	58	5,8 \pm 3,9	48,8 \pm 34,5	Pacifique Nord	[5]
Order Lophiiformes							
<i>Lophius piscatorius*</i>		2	50	0,5	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
Order Myctophiformes							
<i>Hygophum reinhardtii</i>		47	35 [#]	1,3 \pm 0,71	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Loweina interrupta</i>		27	35 [#]	1	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Myctophum aurolanternatum</i>		462	35 [#]	6,0 \pm 8,99	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Symbolophorus californiensis</i>		74	35 [#]	7,2 \pm 8,39	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Diaphus andernesi</i>		13	15,4	< 2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Diaphus fulgens</i>		7	28,6	< 2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Diaphus phillipsi</i>		1	100	< 2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Myctophum nitidulum</i>		25	16	< 2	1,5 (plus grande taille)	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Lobianchia gemellarii</i>		3	33,3	< 2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Bentosema glaciale</i>		27	22	0,33	0,5 – 11,7 (médiane : 1,9)	Océan Atlantique	[21]
<i>Notoscopelus kroyeri</i>		417	14,6	0,16	0,5 – 11,7 (médiane : 1,9)	Océan Atlantique	[21]
Order Osmeriformes							
<i>Osmerus eperlanus</i>	Eperlan	10	20	0,2 \pm 0,42		Estuaire de la Tamise, Angleterre	[24]
<i>Argentina silus</i>	Grande argentine	15	7	0,1 \pm 0,26	0 – 15	Océan Atlantique, Ecosse	[31]
Order Perciformes							
<i>Morone americana</i>	Perche blanche	12	33	-	0,1 – 3	New England (USA)	[4]
<i>Stellifer brasiliensis</i>		330	6,9	0,33 – 0,83	< 1	Estuaire Goiana, Brésil	[6]
<i>Stellifer stellifer</i>		239	9,2	0,33 – 0,83	< 1	Estuaire Goiana, Brésil	[6]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Pomatoschistus minutus</i>	Gobie des sables	200	0 – 25,0	-	1	Estuaire de la Severn, Angleterre	[10]
<i>Eugeres brasilianus</i>		240	16,25	0,37 \pm 0,07	1 - 5	Estuaire Goiana, Brésil	[16]
<i>Eucinostomus melanopterus</i>		141	9,2	0,11 \pm 0,08	1 - 5	Estuaire Goiana, Brésil	[16]
<i>Diapterus rhombeus</i>		44	11,4	0,23 \pm 0,15	1 - 5	Estuaire Goiana, Brésil	[16]
<i>Coryphaena hippurus</i>		42	2	-	-	Pacifique Nord	[5]
<i>Gempylus serpens</i>		104	<1	-	-	Pacifique Nord	[5]
<i>Pagellus bogaraveo</i>		60	1,7	1,3 \pm 0,2	5 - 60	Mer Ionienne, Méditerranée Est	[1]
<i>Pagellus acarne</i>		1	100	1	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Pagellus erythrinus</i>		19	42,1	0,8 \pm 0,2 (S.E)	< 0,1 – 5	Mer Ionienne, Grèce	[36]
<i>Thunnus obesus</i>	Thon obèse	35	9	-	-	Pacifique Nord	[5]
<i>Xiphias gladius</i>	Espadon	31	3	-	-	Pacifique Nord	[5]
<i>Xiphias gladius</i>	Espadon	56	12,5	1,28	3,69 – 55,4 (MP 32%)	Mer Méditerranée	[18]
<i>Trachurus trachurus</i>	Chinchard	56	28,6	1,5 \pm 0,7	2,2 \pm 2,2	Manche	[13]
<i>Trachurus trachurus</i>	Chinchard	100	1	1	1,52	Mer du Nord	[8]
<i>Trachurus trachurus</i>	Chinchard	44	7	0,07 \pm 0,25	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Callionymus lyra</i>	Dragonet lyre	50	38	1,79 \pm 0,9	2,2 \pm 2,2	Manche	[13]
<i>Cepola macrophthalma</i>	Cépole	62	32,3	2,15 \pm 2,0	2,0 \pm 1,9	Manche	[13]
<i>Argyrosomus regius*</i>		5	60	0,80 \pm 0,80	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Boops boops</i>	Bogue	32	9	0,09 \pm 0,3	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Boops boops</i>	Bogue	337	67,7	3,75 \pm 0,25	-	Mer Méditerranée, Espagne	[27]
<i>Brama brama*</i>		3	33	0,67 \pm 1,2	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Decapterus macrosoma *</i>		17	29	2,5 \pm 6,3	> 0,5	Océan Indien	[17]
<i>Decapterus muroadsi</i>		20	80	3,1 \pm 0,4	0,2 – 5	Océan Pacifique	[29]
<i>Dentex macrophthalmus*</i>		1	100	1	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Morone saxatilis</i> *	Bar rayé	7	29	0,9 \pm 1,2	> 0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Mullus surmuletus</i>		1	100	2	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Mullus surmuletus</i> *		3	100	1,66 \pm 0,7	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Mullus barbatus</i>	Rouget de vase	11	64	1,57 \pm 0,78	0,21 \pm 0,20	Mer Adriatique	[2]
<i>Mullus barbatus</i>	Rouget de vase	128	18,8	1,56 \pm 0,5	0,38 – 3,1	Atlantique Nord, Golf de Cadiz, Espagne	[22]
<i>Mullus barbatus</i>	Rouget de vase	25	32	0,5 \pm 0,2 (S.E)	< 0,1 – 1	Mer Ionienne, Grèce	[36]
<i>Siganus argenteus</i> *	Sigan	2	50	0,5 \pm 0,7	> 0,5	Océan Indien	[17]
<i>Siganus canaliculatus</i> *	Sigan	3	33	0,3 \pm 0,6	> 0,5	Océan Indien	[17]
<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	35	31	0,57 \pm 1,04	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	13	31	0,46 \pm 0,78	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	38	13,2	1 – 3	0,18 – 500	Mer du Nord	[19]
<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	13	30,8	1 – 3	0,18 – 500	Mer Baltique	[19]
<i>Thunnus thynnus</i>	Thon rouge	36	32,4	1,45	0,63 – 164,5 (MP 45%)	Mer Méditerranée	[18]
<i>Thunnus alalunga</i>	Thon germon	31	12,9	1	3,6 – 58,52 (MP 75%)	Mer Méditerranée	[18]
<i>Trachurus picturatus</i>	Chinchard bleu	29	3	0,03 \pm 0,18	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Rastrelliger kanagurta</i> *	Maquereau indien	9	55	1,0 \pm 1,1	> 0,5	Océan Indien	[17]
<i>Seriola lalandi</i>	Sériole chicard	19	10,5	1	1 x 0,5 10	Gyre Pacifique Nord	[20]
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar commun	40	23	0,30 \pm 0,61	-	Estuaire du Mondego, Portugal	[34]
<i>Diplodus vulgaris</i>	Sar à tête noire	40	73	3,14 \pm 3,25	-	Estuaire du Mondego, Portugal	[34]
Order Pleuronectiformes							
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Flet américain	95	2,1	-	0,1 – 3	New England, USA	[4]
<i>Platichthys flesus</i>	Flet européen	-	-	Jusqu'à 30	1	Estuaire de la Severn, Angleterre	[11]
<i>Platichthys flesus</i>	Flet européen	1090	0 – 20,7	-	1	Estuaire de la Severn, Angleterre	[10]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Platichthys flesus</i>	Flet européen	20	10	1	0,18 – 500	Mer Baltique	[19]
<i>Platichthys flesus</i>	Flet Européen	66	85	<1	-	Estuaire de la Tamise, Angleterre	[24]
<i>Platichthys flesus</i>	Flet Européen	47	51	0,8 \pm 0,94	0 - 15	Mer du Nord ou Estuaire de Clyde, Ecosse	[31]
<i>Platichthys flesus</i>	Flet Européen	40	13	0,18 \pm 0,55	-	Estuaire du Mondego, Portugal	[34]
<i>Pleuronectes platessa</i>	Plie commune	62	45	0,9 \pm 1,79	0 - 15	Mer du Nord ou Estuaire de Clyde, Ecosse	[31]
<i>Pleuronectes platessa</i>	Plie commune	109	49,5	1,46 \pm 1,02	> 0,5	Mer de Clyde, Angleterre	[32]
<i>Buglossium luteum</i>	Solenette	50	26	1,23 \pm 0,4	1,9 \pm 1,8	Manche	[13]
<i>Microchirus variegatus</i>	Sole perdrix panachée	51	23,5	1,58 \pm 0,8	2,2 \pm 2,2	Manche	[13]
<i>Citharichthys sordidus</i> *		5	60	1,0 \pm 1,2	>0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Limanda limanda</i>	Limande commune	74	5,4	1	0,18 – 500	Mer du Nord	[19]
<i>Limanda limanda</i>	Limande commune	100	0	0	0,3 - 0,4	Mer du Nord	[30]
<i>Limanda limanda</i>	Limande commune	19	47	1,3 \pm 1,67	0 – 15	Mer du Nord ou Estuaire de Clyde, Ecosse	[31]
<i>Lepidorhombus boscii</i>		2	50	-	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	Cardine franche	10	10	0,1 \pm 0,32	0 – 15	Mer du Nord ou Estuaire de Clyde, Ecosse	[31]
<i>Solea solea</i>	Sole	553	95	1,64 – 1,75	< 0,5 : 50-85%	Mer Adriatique, Italie	[35]
Order Salmoniformes							
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> *	Saumon royal	4	25	0,25 \pm 0,5	>0,5	Océan Pacifique	[17]
Order Scorpaeniformes							
<i>Myoxocephalus aeneus</i>		47	4,2	-	0,1 – 3	New England, USA	[4]
<i>Prionotus evolans</i>		1	100	1	0,1 – 3	New England, USA	[4]
<i>Liparis liparis</i>	Limace barrée	220	0 – 25,0	-	1	Estuaire de la Severn, Angleterre	[10]
<i>Aspitrigla cuculus</i>	Grondin rouge	66	51,5	1,94 \pm 1,3	2,1 \pm 2,1	Manche	[13]
<i>Chelidonichthys lucernus</i>		3	67	1,0 \pm 0	0,21 \pm 0,20	Mer Adriatique	[2]
<i>Ophiodon elongatus</i> *	Ophiodon	11	9	0,1 \pm 0,3	> 0,5	Océan Pacifique	[17]

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Sebastes flavidus</i> *	Sébaste à queue jaune	3	33	0,3 \pm 0,6	> 0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Sebastes mystinus</i> *		10	20	0,2 \pm 0,4	> 0,5	Océan Pacifique	[17]
<i>Trigla lyra</i>	Grondin lyre	31	19	0,26 \pm 0,57	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
Order Siluriformes							
<i>Cathorops spixii</i>		60	18	0,47	1 – 4	Estuaire Goiana, Brésil	[15]
<i>Cathorops agassizii</i>		60	33	0,55	1 – 4	Estuaire Goiana, Brésil	[15]
<i>Sciades herzbergii</i>		62	17	0,25	1 – 4	Estuaire Goiana, Brésil	[15]
Order Stomiiformes							
<i>Astronesthes indopacifica</i>		7	35 [#]	1	1 – 2,79	Pacifique Nord	[3]
<i>Sternoptyx diaphna</i>		4	25	<2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Sternoptyx pseudobscura</i>		6	16,6	<2	4,4 (plus grande taille)	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Idiacanthus antrostomus</i>		4	25	<2	-	Gyre Pacifique Nord	[7]
<i>Maurolicus muelleri</i>		282	2,8	0,032	0,5 – 11,7 (médiane : 1,9)	Océan Atlantique	[21]
<i>Stomias boa boa</i>		5	40	0,8	0,5 – 11,7 (médiane : 1,9)	Océan Atlantique	[21]
Order Zeiformes							
<i>Zeus faber</i>	Saint Pierre	42	47,6	2,65 \pm 2,5	2,2 \pm 2,2	Manche	[13]
<i>Zeus faber</i>	Saint Pierre	1	100	1	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
Class Elasmobranchii							
Order Carcharhiniformes							
<i>Scyliorhinus canicula</i> *	Petite roussette	3	67	0,67 \pm 0,68	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Petite roussette	72	15,3	1,56 \pm 0,5	0,38 – 3,1	Atlantique Nord, Espagne	[22]
Order Rajiformes							
<i>Raja asterias</i> *		7	43	0,57 \pm 0,79	-	Atlantique Nord, Portugal	[14]
Order Squaliformes							

Espèce	Nom commun	Nombre d'individu	% d'ingestion	Nombre de débris plastiques/individu \pm S.D	Taille des plastiques (mm) (\pm S.D)	Localisation	Réf
<i>Squalus blainville</i>		75	1,3	1,3 \pm 0,2	5 - 60	Mer Ionienne, Méditerranée Est	[1]
<i>Squalus acanthias</i>		9	44	1,25 \pm 0,5	0,21 \pm 0,20	Mer Adriatique	[2]

[#] Indique des résultats moyen sur l'ensemble des individus échantillonné ; * Indique des individus échantillonnés sur des marchés ; - : indique une absence de données ; S.E : Erreur-type

Références bibliographique : [1] Anastasopoulou *et al.* (2013) ; [2] Avio *et al.* (2015a) ; [3] Boerger *et al.* (2010) ; [4] Carpenter *et al.* (1972) ; [5] Choy et Drazen (2013) ; [6] Dantas *et al.* (2012) ; [7] Davison et Asch (2011) ; [8] Foekema *et al.* (2013) ; [9] Jantz *et al.* (2013) ; [10] Kartar *et al.* (1976) ; [11] Kartar *et al.* (1973) ; [12] Kripa *et al.* (2014) ; [13] Lusher *et al.* (2013) ; [14] Neves *et al.* (2015) ; [15] Possatto *et al.* (2011) ; [16] Ramos *et al.* (2012) ; [17] Rochman *et al.* (2015b) ; [18] Romeo *et al.* (2015) ; [19] Rummel *et al.* (2016) ; [20] Gassel *et al.* (2013) ; [21] Lusher *et al.* (2015b) ; [22] Bellas *et al.* (2016) ; [23] Bråte *et al.* (2016) ; [24] McGoran *et al.* (2017) ; [25] Liboiron *et al.* (2016) ; [26] Tanaka et Takada (2016) ; [27] Nadal *et al.* (2016) ; [28] Collard *et al.* (2017b) ; [29] Ory *et al.* (2017) ; [30] Hermsen *et al.* (2017) ; [31] Murphy *et al.* (2017) ; [32] Welden *et al.* (2018) ; [33] Kühn *et al.* (2018) ; [34] Bessa *et al.* (2018) ; [35] Pellini *et al.* (2018) ; [36] Digka *et al.* (2018)

II.2.3 Produits transformés

Comme énoncé dans la section II.1.1.2 de ce chapitre, en France, en 2016, la consommation de produits de la pêche ayant été transformés est plus importante que celle des produits frais (FranceAgriMer, 2017). La même tendance est observée au niveau mondial avec une commercialisation de 54% des produits de la pêche sous forme transformée et 46% non transformée. Il est toutefois à noter que ces données mondiales masquent des différences très marquées de consommation entre les continents (FAO, 2016).

A ce jour, peu d'études ont été réalisées sur la contamination par les MP des produits de la pêche transformés malgré leurs importances commerciales. Une étude réalisée sur la contamination des conserves de sardines (*Sardina* spp.) et de sprat (*Sprattus* spp.) a montré la présence de MP et d'additifs, c'est à dire colorant et dioxyde de titane, dans ces conserves (Karami *et al.*, 2018). Les auteurs estiment que cette contamination peut être à l'origine de l'ingestion par le consommateur de conserve aux USA de 1 à 5 MP/habitant/an (Karami *et al.*, 2018). Une autre étude a été réalisée sur des poissons séchés collectés sur un marché en Malaisie (Karami *et al.*, 2017a). Dans cette étude, des MP sont retrouvés dans la chair de quatre espèces de poissons éviscérés communément consommés en Asie (*Rastrelliger kanagurta*, *Stolephorus waitei*, *Chelon subviridis* et *Johnius belangerii*) et les auteurs estiment que ceci peut conduire à l'ingestion de 0 à 246 MP/consommateur/an (Karami *et al.*, 2017a). Il est important de noter que pour ces deux études, les auteurs ont utilisé des filtres de porosité de 149 µm pour rechercher les MP, ce qui exclue de leurs recherches les MP de tailles inférieurs à 149 µm représentant une sous-estimation de la contamination de ces produits transformés. En effet, il a été démontré que les MP présents dans les produits de la pêche et notamment les bivalves sont essentiellement de petites tailles c'est à dire <100 µm (Phuong *et al.*, 2018a; Phuong *et al.*, 2018b)

De plus, les auteurs considèrent uniquement la translocation des MP comme voie de contamination de ces produits et ne prennent pas en compte une potentielle contamination aéroportée venant des lieux de commerce ou des bâtiments de transformation (Karami *et al.*, 2017a; Karami *et al.*, 2018). Ce type de contamination paraît très probable aux vues de récentes études (Dris *et al.*, 2016; Dris *et al.*, 2015) et du fait que les poissons séchés sont, notamment, vendus à l'air libre en Asie.

La présence de MP a été mise en évidence dans d'autres produits destinés à la consommation humaine comme le sel de table (Iñiguez *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017b; Yang *et al.*, 2015), le miel (Liebezeit et Liebezeit, 2013), la bière (Liebezeit et Liebezeit, 2014) et l'eau potable en bouteilles (Mason *et al.*, 2018; Oßmann *et al.*, 2018; Schymanski *et*

al., 2018). Certains produits comme le sel par exemple, rentre aussi dans le processus de transformation du poisson et peut alors s'ajouter à une possible contamination aux MP de la matière première.

II.3 Impacts des microplastiques sur les organismes marins

La présence de MP dans l'ensemble des environnements marins (section I.2.3) favorise leur ingestion par un grand nombre d'espèces marines allant du phytoplancton jusqu'aux mammifères marins. Il a été démontré que 208 espèces marines différentes peuvent ingérer ces MP dans le milieu naturel (Gall et Thompson, 2015). Ces ingestions de MP (section II.2) directes ou indirectes via l'alimentation ou le transfert trophique (Eriksson et Burton, 2003; Farrell et Nelson, 2013; Murray et Cowie, 2011; Welden *et al.*, 2018) peuvent avoir des effets sur les organismes marins et sur l'Homme (section II.4).

Toutes les études présentées dans cette section ont été réalisées en laboratoire. Afin de mieux appréhender les effets des MP sur les organismes marins, il est nécessaire d'effectuer les expositions avec des concentrations les plus proches possibles de celles de l'environnement (Lenz *et al.*, 2016). Néanmoins, l'utilisation de concentrations plus importantes que celles de l'environnement permet aussi d'évaluer le risque de nouveaux contaminants (Huvet *et al.*, 2016). La Figure 11 présente des exemples de concentrations utilisées dans plusieurs études ainsi que les concentrations environnementales trouvées dans des échantillons d'eau de mer.

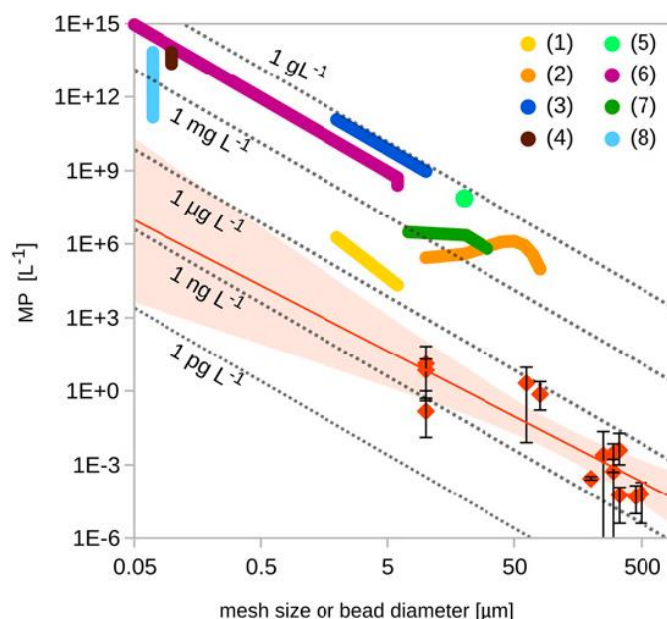


Figure 11 : Comparaison entre les concentrations de MP utilisées dans les études d'exposition (lignes de couleur grasse) et les niveaux environnementaux observés (losanges rouges: concentrations moyennes, barres d'erreur: concentration minimale et maximale). La ligne rouge extrapole les données de terrain avec le meilleur ajustement en utilisant une régression de la loi de puissance (intervalles de confiance de 95% sous forme de zones rouge pâle). D'après Lenz *et al.* (2016). (1) Sussarellu *et al.* (2016) ; (2) von Moos *et al.* (2012) ; (3) Browne *et al.* (2008) ; (4) Besseling *et al.* (2013) ; (5) Cole *et al.* (2015) ; (6) Lee *et al.* (2013) ; (7) Cole *et al.* (2013) ; (8) Besseling *et al.* (2014).

II.3.1 Interactions avec le phytoplancton et le zooplancton

Le phytoplancton constitue le premier maillon de la chaîne trophique en milieu marin. La production primaire est alors réalisée par les microalgues qui sont des organismes unicellulaires photosynthétiques. Ces organismes peuvent être affectés par la présence de MP dans le milieu marin (Bhattacharya *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2016; Sjollema *et al.*, 2016). En effet, une étude sur les effets de différents types de MP sur le microphytobenthos associé à l'Arénicole *Arenicola marina* met en évidence que la présence de MP diminue significativement la biomasse de ces microalgues (Green *et al.*, 2016). Une autre étude a mis en évidence que la présence de microbilles de 0,05 μm à 250 mg/L diminue de 45% la densité cellulaire et donc la croissance d'une microalgue ciliée (*Dunaliella tertiolecta*) (Sjollema *et al.*, 2016). Cette même étude ne met en évidence aucune altération de la photosynthèse chez trois espèces de microalgues exposées à des MP : *D. tertiolecta*, *Thalassiosira pseudonana* et *Chlorella vulgaris*. Néanmoins, une étude exposant du phytoplancton à des particules de nanoplastiques, inférieures à 70 nm à 1,8 mg/L, montre que ces particules peuvent s'attacher aux microalgues et diminuer leur photosynthèse (Bhattacharya *et al.*, 2010). La diminution de la biomasse et de la croissance (Green *et al.*, 2016; Sjollema *et al.*, 2016) ainsi qu'une diminution de la photosynthèse (Bhattacharya *et al.*, 2010) suite à l'exposition à des MP ou des nanoplastiques peuvent avoir des répercussions sur le reste de la chaîne trophique du

milieu marin. Néanmoins, ces études ont utilisé des concentrations fortes en MP et une étude réalisée par Long *et al.* (2017) montre que l'exposition de phytoplanctons marins : *Chaetoceros neogracile*, *Tisochrysis lutea* et *Heterocapsa triquetra*, à des concentrations de 3,96 et 39,6 µg/L (soit $9 \cdot 10^5$ et $9 \cdot 10^6$ MP/mL) de MP de PS (2 µm) n'a pas d'effet significatif sur la croissance et le contenu en chlorophylle de ces trois espèces de microalgues.

Le zooplancton correspond aux animaux planctoniques vivant dans la colonne d'eau. Ces animaux peuvent être herbivores, se nourrissant de phytoplancton, ou bien carnivores, se nourrissant alors d'autres organismes zooplanctoniques. Le zooplancton est souvent considéré comme un maillon important de la microchaîne trophique car il est consommé par un grand nombre d'organismes. L'ingestion de MP en laboratoire a été démontrée dans plusieurs études et ceci pour différentes espèces de zooplancton (Cole *et al.*, 2014; Cole *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Setälä *et al.*, 2014; Setälä *et al.*, 2016). De plus, une diminution du taux d'ingestion de microalgues chez le copépode *Centropages typicus* liée à la présence de MP dans l'environnement a été montrée (Cole *et al.*, 2013). Dans une autre étude, le copépode *Tigriopus japonicus* ingère des microbilles de polystyrène de trois tailles différentes, 0,05 µm, 0,5 µm et 6 µm, même en présence de phytoplancton (Lee *et al.*, 2013). Cette espèce survit à un essai de toxicité aiguë (0 à 313 µg de PS/mL – 96h), mais la survie a été affectée lors de l'exposition chronique, sur 2 générations, aux microbilles de 0,05 µm à une concentration de 1,25 µg/mL ($9,1 \cdot 10^{11}$ microbilles/mL). Des effets sur la fécondité des individus ont également été observés suite aux expositions chroniques aux microbilles de 0,5 et 6 µm (Lee *et al.*, 2013). Cette dernière étude a bien montré qu'une exposition chronique peut avoir des conséquences sur la fécondité d'une espèce. Lee *et al.* (2013) ont suggéré que la diminution de la fécondité pourrait être liée à une diminution de la prise alimentaire limitant la production d'œufs ou bien que les œufs pourraient être directement « cassés » par les microbilles de polystyrène. Cette deuxième hypothèse est confirmée par les auteurs par observations d'œufs ne se développant pas (Lee *et al.*, 2013).

II.3.2 Interactions avec les bivalves marins

Les bivalves sont des organismes filtreurs, ils peuvent ingérer des MP présents en suspension dans l'environnement. Les moules (*Mytilus edulis*) et les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) sont les espèces principalement étudiées (Browne *et al.*, 2008; Cole et Galloway, 2015; Sussarellu *et al.*, 2016; von Moos *et al.*, 2012; Wegner *et al.*, 2012) du fait notamment de leur intérêt économique et de leur présence sur l'ensemble des côtes européennes.

Chez la moule, l'exposition en laboratoire à 15 000 microbilles (par individu), de particules de polystyrène de 3 et 9,6 μm entraîne une rétention de ces particules dans l'estomac et un transfert de ces particules dans le système circulatoire mais sans effet sur l'activité de filtration (Browne *et al.*, 2008). La translocation des microbilles de 3 μm est plus importante que celles de 9,6 μm et elle est observable après 3 jours d'expérience et pendant 48 jours (Browne *et al.*, 2008). En revanche, Wegner *et al.* (2012) ont montré que l'exposition à trois concentrations différentes de billes de polystyrène de 30 nm ($6,4 \cdot 10^{12}$, $1,3 \cdot 10^{13}$ et $1,9 \cdot 10^{13}$ billes/mL par individu) réduit la filtration de moules exposées. De plus, le taux de filtration diminue d'autant plus que la concentration en billes de polystyrène présentes dans l'eau de mer environnante augmente (Wegner *et al.*, 2012). Une autre étude en laboratoire (von Moos *et al.*, 2012) a montré que l'exposition de moules à 2,5 g/L de MP de PEHD de taille $<80 \mu\text{m}$ provoque l'accumulation de ces MP au niveau des branchies et de la glande digestive. Par ailleurs, la présence de ces MP dans la glande digestive déclenche, au bout de 6h, une forme de réponse immunitaire via la formation de granulocyte et la perturbation de l'intégrité de la membrane (von Moos *et al.*, 2012). Il a aussi été montré qu'après l'ingestion, les moules rejettent par les fèces les MP ingérés (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). De plus, Van Cauwenberghe *et al.* (2015) ont montré qu'après exposition à des microbilles de PE de 10, 30 et 90 μm à 110 microbilles/mL, les moules retiennent plus facilement les particules de 10 μm en comparaison avec les autres tailles de particules.

Pour les huîtres, Cole et Galloway (2015) ont montré que les larves d'huîtres ingèrent des billes de polystyrène de tailles allant de 0,07 à 20,3 μm et que plus les larves sont âgées plus les billes ingérées sont de grandes tailles. Mais ni le taux d'ingestion ni le taux de croissance des larves d'huître n'ont été affectés suite à l'exposition (Cole et Galloway, 2015). Une étude récente exposant des huîtres matures à deux concentrations (200 et 2000 billes/mL) de bille de polystyrène de 2 et 6 μm a mis en évidence une augmentation de la consommation de phytoplancton et une augmentation de l'efficacité d'absorption en présence des billes (Sussarellu *et al.*, 2016). De plus, une diminution du nombre d'ovocytes ainsi qu'une diminution de la vitesse des spermatozoïdes ont été observées suite à l'exposition de ces huîtres aux MP pendant leur gamétogénèse (Sussarellu *et al.*, 2016). Ces diminutions semblent être attribuées à une réduction de l'énergie allouée à la reproduction se dirigeant vers la maintenance de l'organisme chez les huîtres exposées (Sussarellu *et al.*, 2016).

II.3.3 Interactions avec les poissons

Les poissons interagissent avec les MP présents dans l'environnement que ce soit de manière indirecte, c'est à dire par l'ingestion de proies contaminées, ou directe, c'est à dire les MP peuvent être confondus avec une proie potentielle (Ory *et al.*, 2017). Il a été montré que chez le gobie commun (*Pomatoschistus microps*) l'ingestion dépend de la couleur des MP et que la présence de MP dans l'eau peut diminuer la performance et l'efficacité de prédation des gobies (de Sá *et al.*, 2015). Dans une étude exposant des poissons rouges (*Carassius auratus*) à des microbilles et des microfibres via la nourriture, Grigorakis *et al.* (2017) ont montré que ces MP étaient évacués au bout de 10 à 33,4 h pour 50 à 90% des MP ingérés. De plus, aucune différence significative ($p\text{-value} > 0,05$ – ANCOVA) de temps de rétention n'a été démontrée en fonction de la forme (microbilles vs microfibres) des MP ingérés (Grigorakis *et al.*, 2017). Concernant les effets causés par les MP sur le tractus digestif des poissons, une exposition à des fragments de PVC (<300 μm) via la nourriture (0,1% p/p) chez le bar *Dicentrarchus labrax* pendant 90 jours a engendré une détérioration structurale et fonctionnelle de l'intestin, spécialement de la partie distale (Pedà *et al.*, 2016).

Dans une autre étude sur l'exposition de larves de bar (*D. labrax*) à des microbilles de PE (10 – 45 μm) à travers la nourriture, 10^4 ou 10^5 microbilles/g de nourriture, des effets limités ont été observés notamment sur la survie et sur la croissance de ces larves même si celles-ci ingèrent les microbilles pour la concentration de 10^4 MP/g de nourriture (Mazurais *et al.*, 2015). Néanmoins, un stress oxydatif chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) a été observé suite à l'exposition pendant 3 semaines à des microbilles de PS de 5 μm à des concentrations de 290, 2 900 et 29 000 MP/mL (Lu *et al.*, 2016).

II.3.4 Interactions avec d'autres organismes

Les MP peuvent interagir avec d'autres organismes et peuvent alors avoir des effets délétères. En effet, une étude sur quatre espèces différentes d'holothuries a montré que ces espèces peuvent ingérer des MP de différentes familles, PVC et polyamide, et aussi de différentes formes comme les fragments, les filaments et les pellets (Graham et Thompson, 2009). De plus, les mêmes auteurs montrent que ces espèces ingèrent sélectivement les particules de MP en comparaison avec les grains de sable. Les arénicoles (*Arenicola marina*) ingèrent sélectivement les MP de 10 et 30 μm suite à une exposition en laboratoire (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). Il a aussi été montré que l'ingestion de MP d'uPVC (PVC non plastifié) chez l'arénicole diminue leurs réserves énergétiques suite à une diminution de la prise alimentaire (Wright *et al.*, 2013b). De plus, une étude sur l'exposition des arénicoles à

différentes concentrations : 0,02%, 0,2% et 2% de MP/sédiments humide (p/p), de trois familles de plastiques : PVC, PEHD et acide polylactique (PLA), montre que les arénicoles diminuent leurs activités de bioturbation ainsi que leurs activités d'alimentation en présence des MP (Green *et al.*, 2016). Il semblerait aussi que le PVC ait plus d'effet sur les arénicoles que les deux autres familles de plastiques (Green *et al.*, 2016).

L'ingestion, en laboratoire, de MP a aussi été montrée chez des espèces de crustacés, notamment chez le crabe vert (*Carcinus maenas*). En effet, Watts *et al.* (2014) ont exposé des crabes à des microbilles de polystyrène (8-10 μm) via leur alimentation, en mettant à leur disposition des moules artificiellement exposées à $1,0 \cdot 10^3$ microbilles/mL, le tout dans une eau présentant une concentration en microbilles de 40 à 940 billes/mL. Les auteurs ont montré que les crabes ingéraient les microbilles via la consommation des moules (Farrell et Nelson, 2013) mais aussi via l'eau et que ces microbilles ont été observées sur les branchies des individus exposés (Watts *et al.*, 2014). De plus, les mêmes auteurs ont mis en évidence une diminution de l'énergie disponible pour la croissance suite à l'exposition des crabes verts à des fibres de PP (Watts *et al.*, 2015). En outre, ces fibres se cassaient lors du passage dans les organes intestinaux diminuant, *de facto*, leurs tailles (Watts *et al.*, 2015). Une autre espèce de crabe, *Uca rapax*, a été étudiée, elle a été exposée à une quantité de 108 et 1000 mg de PS/kg sec de sédiment avec des microbilles mesurant entre 180 et 250 μm . L'étude montre que ces particules ont été ingérées par les crabes et qu'elles ont été retrouvées dans l'estomac, l'hépatopancréas et les branchies des individus exposés (Brennecke *et al.*, 2015). Des études (Welden et Cowie, 2016a, b) sur les langoustines (*Nephrops norvegicus*) ont montré que les individus ayant récemment mués ne contiennent plus de MP dans leurs tractus digestifs contrairement aux individus n'ayant pas mués. De plus, lors d'une exposition sur le long terme, des langoustines exposées à des fibres de PE via la nourriture ont présenté des signes de dépression métabolique : diminution de la taille, diminution de l'apport en nutriments, diminution du taux d'alimentation et diminution des lipides de réserves (Welden et Cowie, 2016a). Les auteurs ont discuté le fait que cette dépression métabolique pourrait avoir des conséquences au niveau de la population de langoustines via une diminution de la production d'œufs et donc une diminution de la quantité de descendance produite (Welden et Cowie, 2016a).

II.4 Dangers associés pour la consommation humaine

II.4.1 Ingestion de microplastiques par la consommation d'invertébrés marins

Certains auteurs ont estimé la contribution de l'apport de la consommation de bivalves dans l'exposition des consommateurs aux MP (Catarino *et al.*, 2018; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014). Dans l'étude de Van Cauwenberghe et Janssen (2014), il a été estimé qu'un consommateur important de mollusques (72,1 g/jour pour un Belge) peut consommer 11 000 MP/an alors qu'un faible consommateur (11,8 g/jour pour un Irlandais) peut consommer 1 800 MP/an via la consommation de bivalves. Dans une autre étude, Catarino *et al.* (2018) ont estimé qu'un britannique pouvait consommer 123 MP/an du fait de leur faible consommation de moules et les auteurs ont aussi estimé qu'un consommateur important européen (Belges, Français et Espagnol) pouvait consommer 4 620 MP/an via leur consommation de moules. Néanmoins, Catarino *et al.* (2018) ont démontré que la contamination aéroportée aux MP lors de la préparation et de la consommation du dîner représente un niveau de contamination plus important que celui lié à la consommation de bivalves. En effet, l'ingestion de MP lors d'un repas du soir est de 13 731 à 68 415 MP/an (Catarino *et al.*, 2018).

II.4.2 Interactions avec le système digestif

Lors de la consommation par l'Homme de produits de la pêche contaminés par des MP, des particules plastiques peuvent être ingérées par le consommateur. En effet, la consommation de bivalves entiers (moules, huîtres, coques ...) contaminés va avoir pour conséquence l'ingestion de MP par l'Homme. Contrairement à la majorité des bivalves, en Europe, les poissons ne sont pas consommés entiers et seulement les filets sont mangés. Ceci n'est pas forcément vrai dans tous les pays du monde. Néanmoins, l'ingestion de MP par l'Homme via la consommation des parties consommables des poissons nécessite que les MP passent la barrière intestinale vers les muscles. Ce phénomène est appelé translocation.

Actuellement, peu d'informations existent sur la translocation des MP présents dans le système digestif vers les muscles des poissons. Néanmoins, plusieurs études, réalisées en laboratoire et dans le milieu naturel, ont cherché à étudier la translocation de MP chez plusieurs espèces de poissons. Dans une étude réalisée par Avio *et al.* (2015a), des mulets cabots (*Mugil cephalus*) ont été exposés à des particules de PE et de PS (100-1000 µm) à une concentration de 2 500 MP/L. La translocation a été évaluée en digérant les foies de 50% des poissons et en réalisant des analyses histologiques afin de localiser les MP sur les foies. Dans cette étude, la présence de MP de PS et de PE dans les foies des mulets cabots a été montrée,

avec une prévalence bien inférieure à la présence des MP dans les tractus digestifs. Les MP présents dans les foies mesuraient entre 200 et 600 μm (Avio *et al.*, 2015a). Récemment, quatre études ont mentionné que la translocation était possible chez des poissons prélevés dans le milieu naturel (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Collard *et al.*, 2017a; Collard *et al.*, 2018). Des MP de tailles allant de 124 à 438 μm ont été retrouvés dans les foies de trois espèces (*Eugraulis encrasicolus*, *Clupea harengus* et *Sardina pilchardus*) pêchées en mer Méditerranée et en mer du Nord (Collard *et al.*, 2017a). Dans une autre étude réalisée par la même auteure, des MP de taille allant de 147 à 567 μm ont été trouvés dans les foies d'une espèce (*Squalius cephalus*) prélevée dans la Seine en région parisienne (Collard *et al.*, 2018). Dans une autre étude, des MP de grandes tailles (<100 à >5000 μm) ont été retrouvés à de fortes concentrations (5,66 à 18,5 MP/10 g de filet, en moyenne) dans les filets de plusieurs espèces de poissons des côtes Irlandaises (Akhbarizadeh *et al.*, 2018). Une autre étude réalisée sur des espèces de poissons (*Platycephalus indicus*, *Saurida tumbil*, *Sillago sihama* et *Cynoglossus abbreviatus*) et une espèce de crevette (*Penaeus semisulcatus*) des côtes Irlandaises a montré la présence de MP sous forme de fibres dans le foie et les muscles des quatre espèces de poisson et dans le muscle des crevettes (Abbasi *et al.*, 2018). Concernant ces quatre études (Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Avio *et al.*, 2015a; Collard *et al.*, 2017a; Collard *et al.*, 2018), il est important de noter que les différents auteurs n'ont jamais pris en compte une quelconque contamination aéroportée (Dris *et al.*, 2016) comme sources potentielles des MP trouvés dans les organes. En effet, dans les études de Collard *et al.* (2017a) et Collard *et al.* (2018), la dissection des foies a été réalisée à bord d'un bateau, ce qui n'apparaît pas comme le lieu le plus protégé contre la contamination aéroportée. Dans l'étude d'Akhbarizadeh *et al.* (2018), l'identification réalisée n'est que visuelle (section III.2) ce qui n'est pas suffisant pour caractériser la nature plastique des particules retrouvées dans les muscles. Dans l'étude d'Abbasi *et al.* (2018), l'identification est réalisée avec un microscope électronique à balayage (SEM) équipé d'une analyse dispersive en énergie (EDS). L'identification en SEM-EDS permet seulement de savoir si la particule analysée est de nature synthétique ou non. Une identification de la nature polymérique est nécessaire ensuite. De plus, la plupart des particules sont des fibres ce qui est la majorité des particules retrouvées dans les dépôts atmosphériques (Dris *et al.*, 2016; Dris *et al.*, 2015). Outre le fait de ne pas considérer de potentielles contaminations, ces quatre études (Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Avio *et al.*, 2015b; Collard *et al.*, 2017a) ne discutent pas, ou peu, le fait de retrouver des particules de tailles supérieures à 100 μm dans les tissus des poissons. Comme discuté

dans le paragraphe suivant, la translocation chez les poissons ne semble possible que pour des particules de l'ordre de 10 μm et moins, c'est à dire des nanoplastiques.

L'étude de la translocation des MP et des nanoplastiques ($<0,1 \mu\text{m}$) a aussi été réalisée pour un autre domaine d'application : l'utilisation de ces particules comme vecteur de vaccins (Kim *et al.*, 2010). Pour les poissons, ce mode d'administration des vaccins a aussi été étudié. Chez le saumon (*Salmo salar*), la présence de microbilles de PS de 0,045 μm , 0,134 μm , 0,49 μm , 1 μm et 3 μm n'est pas observée dans les organes suivants : rate, foie et rein et ni dans le sang suite à une exposition à $5 \cdot 10^6$ MP/poisson via une intubation stomacale (Dalmo *et al.*, 1995). Ceci suggère que même des particules de diamètre de 45 nm n'ont pas franchi la barrière intestinale pour se retrouver dans le système circulatoire des saumons (Dalmo *et al.*, 1995). Dans une autre étude réalisée sur le saumon, l'intubation anale de $4 \cdot 10^6$ particules de latex/poisson résulte en la présence de MP de 0,1 μm , 0,5 μm , 1 μm et 3 μm dans la rate et les reins des saumons (Petrie et Ellis, 2006) avec toutefois une majeure partie des MP se retrouvant dans la lumière de l'intestin. Lors d'une intubation orale avec la même concentration de MP de latex la présence de ces microparticules n'a pas été observée hors de la lumière de l'intestin. De plus, l'exposition a été aussi réalisée avec des MP de 10 μm qui n'ont jamais été retrouvés hors de l'intestin (Petrie et Ellis, 2006). Les deux études réalisées (Dalmo *et al.*, 1995; Petrie et Ellis, 2006) sur le saumon présentent des résultats différents concernant la translocation chez cette espèce, cependant il semblerait que la translocation ne soit pas possible pour des particules ayant des tailles de l'ordre de la dizaine de micromètres. Dans une étude utilisant le poisson zèbre (*D. rerio*) comme modèle, il a été montré que la translocation de particule de PS de 1 μm n'était pas possible alors que la présence de particules de 0,5 μm a été observée dans les reins suite à une intubation orale de $5 \cdot 10^7$ MP/poisson (Løvmo *et al.*, 2017). Dans une autre étude réalisée en laboratoire, Lu *et al.* (2016) ont exposé des poissons zèbres (*D. rerio*) à des MP de PS de 5 et 20 μm à une concentration de $2,9 \cdot 10^5$ MP/mL et $4,5 \cdot 10^3$ MP/mL, respectivement. En réalisant des coupes histologiques des organes, les MP de 5 μm ont été observés dans le foie, le tractus digestif et les branchies des poissons zèbres alors que les MP de 20 μm ont été observés seulement dans l'estomac et les branchies des animaux exposés (Lu *et al.*, 2016). Dans ces travaux, Lu *et al.* (2016) n'ont pas mentionné un phénomène de translocation mais il est possible d'émettre l'hypothèse d'un tel phénomène. L'ensemble de ces quatre études (Dalmo *et al.*, 1995; Løvmo *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2016; Petrie et Ellis, 2006) met en évidence que la translocation est peu probable chez deux espèces de poissons pour des tailles de MP supérieures à la dizaine de micromètres. Dans ces études, les quantités intubées ou utilisées, sont très

importantes en comparaison avec la quantité de MP retrouvée dans le milieu marin. De plus, quand des MP sont retrouvés dans des tissus autres que la lumière de l'intestin, la quantité présente est très faible.

La consommation des parties consommables des poissons peut donc représenter un danger pour le consommateur mais ce danger se cantonnerait aux MP mesurant moins que 10 μm . Actuellement, peu d'informations sont disponibles sur ces petits MP car les techniques d'extraction et d'identification sont limitées (section III). Toutefois, il est important de noter qu'à ce jour le transfert d'additif plastique via l'ingestion de MP a été peu étudié. Ces polluants pourraient s'accumuler dans les tissus des poissons ou des bivalves lors de l'ingestion des MP.

Après ingestion de MP via la consommation de bivalves entiers ou la consommation des filets contaminés, une des questions qui se pose est de savoir si la translocation des MP est possible chez l'Homme. Si celle-ci survient alors les organes ainsi que les tissus sont exposés aux MP. Cette exposition est double : exposition aux MP en tant que particules abrasives et aussi aux mélanges de polluants qu'ils contiennent (section II.4.3 et II.4.4). Contrairement aux poissons, les mammifères possèdent des cellules particulières appelés les cellules M qui se situent au-dessus des plaques de Peyer. Ces cellules peuvent être un site d'absorption des MP présents dans la lumière intestinale vers les tissus lymphatiques (Galloway, 2015; Wright et Kelly, 2017). La translocation chez les mammifères, à travers le système intestinal vers le système lymphatique, est possible pour une multitude de polymères plastiques de tailles différentes. En effet, la translocation chez l'homme de particules de 0,2 à 150 μm , chez le chien de particules de 3 à 100 μm , chez les rongeurs de 30 à 40 μm et chez les lapins de 0,1 à 10 μm a été démontrée (Hussain *et al.*, 2001). Dans une étude exposant des souris (*Mus musculus*) à des MP de PS de 5 et 20 μm via l'eau, Deng *et al.* (2017) ont retrouvé ces particules dans les reins et le foie des souris. Même si la translocation est possible chez les mammifères, il semblerait que ce phénomène soit limité. La translocation de particules de 2 μm de latex est seulement de 0,04 à 0,32% de la dose initiale chez plusieurs espèces de rongeurs (Carr *et al.*, 2012). La même chose est observée in vitro avec des biopsies de tissus humains issus du colon en utilisant une chambre d'Ussing : une translocation de 0,25% de MP de polylactide-co-glycolide de 3 μm (Schmidt *et al.*, 2013).

Il existe peu de données concernant la translocation de MP chez les mammifères et chez l'Homme en particulier. Néanmoins, la translocation semblerait impossible pour des particules de tailles supérieures à 150 μm et limitée (<1%) pour les particules mesurant moins de 150 μm (Wright et Kelly, 2017).

Il est nécessaire de réaliser des études complémentaires pour savoir si la translocation des MP est possible vers les parties consommables des poissons et ceci afin de savoir si l'Homme ingère ces MP via la consommation de poissons. De plus, les MP ne sont pas seulement des particules inertes mais contiennent un cocktail de produits chimiques peu étudiés (dont les additifs) et ils peuvent représenter une voie potentielle de transport de micro-organismes pathogènes.

II.4.3 Contaminants biologiques

Du fait de leur caractère ubiquitaire, de leur propriété de flottabilité et de leur grande surface, les MP peuvent servir de « radeau » et être colonisés par un certain nombre d'organismes incluant des mollusques, des arthropodes et des cnidaires par exemple (Goldstein *et al.*, 2012). Il a aussi été montré que les MP peuvent être colonisés par des microorganismes comme des bactéries (Zettler *et al.*, 2013). La dissémination des bactéries via les MP peut être une source possible d'agents pathogènes pour la vie marine et pour l'Homme dans des environnements dont ils étaient absents auparavant (Barnes, 2002). En effet, en milieu océanique il a été démontré que la communauté bactérienne colonisant les MP n'est pas la même que celle du milieu environnant (Zettler *et al.*, 2013). Les auteurs (Zettler *et al.*, 2013) définissent les plastiques comme de nouveaux habitats pour les bactéries qu'ils appellent la « Plastisphere ». De plus, plusieurs études ont montré la présence du genre *Vibrio* associé aux MP (Kirstein *et al.*, 2016; Zettler *et al.*, 2013). Les bactéries du genre *Vibrio* peuvent être pathogènes pour certains organismes marins (Petton *et al.*, 2015) et d'autres peuvent être pathogènes pour l'Homme (Altekruse *et al.*, 2000; Austin, 2005). Dans les mers du Nord et Baltique, une espèce de *Vibrio* pathogène pour l'Homme (*Vibrio parahaemolyticus*) a été retrouvée associée à plusieurs types de polymère plastique (PP, PE et PS) (Kirstein *et al.*, 2016). De plus, il a été démontré que la colonisation de microbilles de PS par *Vibrio crassostreae* nécessite au préalable la formation d'un biofilm (Foulon *et al.*, 2016). Les auteurs (Foulon *et al.*, 2016) suggèrent que *Vibrio crassostreae* est un colonisateur secondaire de MP. Comme suggéré précédemment, les MP peuvent servir de vecteur de pathogènes comme les *Vibrio* dans de nouveaux environnements et vers les organismes incluant l'Homme (Keswani *et al.*, 2016). Néanmoins, à ce jour aucune étude n'a été réalisée sur le rôle des MP potentiellement vecteur de pathogènes vers les organismes.

II.4.4 Contaminants chimiques

Les MP sont des particules pouvant contenir une grande quantité de produits chimiques. En effet, des produits chimiques, appelés additifs plastiques, sont ajoutés à la matrice

polymérique dès la production des plastiques afin de donner des caractéristiques bien précises à ces particules (OECD, 2004). De plus, du fait de leur caractère hydrophobe, les MP adsorbent et concentrent à leurs surfaces d'autres produits chimiques hydrophobes comme les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les Polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE), et les pesticides organochlorés. De plus, les métaux lourds peuvent aussi être adsorbés à la surface des MP (Engler, 2012; Hong *et al.*, 2017) (Figure 12).

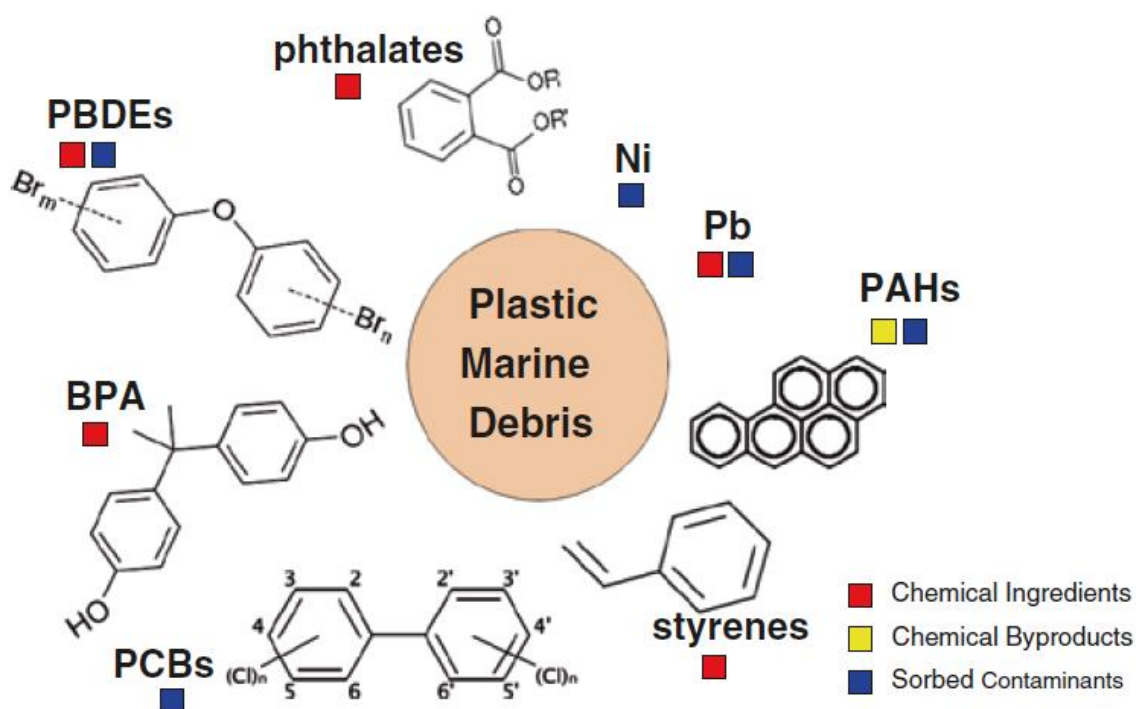


Figure 12 : Produits chimiques associés aux microplastiques et aux débris plastiques marins en général. Ces produits chimiques sont les additifs plastiques (« Chemical Ingredients » et « Chemical Byproducts ») et les polluants adsorbés à la surface (« Sorbed Contaminant »). D'après Rochman (2015).

II.4.4.1 Contaminants chimiques adsorbés

Depuis la révolution industrielle, de grandes quantités de produits chimiques sont utilisées. Depuis quatre décennies la production de ces produits chimiques a été multipliée par 400 avec un nombre de produits chimiques enregistrés qui dépasse les 88 millions en 2006 (Binetti *et al.*, 2008). Ces produits chimiques, malgré des systèmes de traitement des déchets solides et liquides performants, se retrouvent dans l'environnement marin et peuvent s'y accumuler et y persister. La présence de ces polluants chimiques ainsi que la présence de MP dans l'environnement soulèvent quelques questions sur le potentiel rôle de ces MP comme vecteurs de ces polluants vers les organismes.

Les MP sont actuellement utilisés comme échantillonneurs passifs de polluants organiques persistants (POP) (International Pellet Watch, 2017; Takada, 2006) grâce à leurs fortes affinités pour les polluants hydrophobes. En effet, de fortes concentrations de PCB et

de dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) ont été retrouvées sur des particules de PP provenant de la Baie de Tokyo (Mato *et al.*, 2001). D'autres études ont démontré la présence de PCB en concentrations variables sur des MP prélevés sur les plages (Gauquie *et al.*, 2015; Hirai *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2012) et dans les océans (Hirai *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2007; Teuten *et al.*, 2009). D'autres types de polluants comme les HAP (phénanthrène, pyrène ...) (Gauquie *et al.*, 2015; Hirai *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2007; Van *et al.*, 2012), des pesticides (DDE) (Mato *et al.*, 2001; Rios *et al.*, 2007; Van *et al.*, 2012) et des métaux lourds (Cuivre, Zinc, Fer, Chrome, Plomb ...) (Ashton *et al.*, 2010; Brennecke *et al.*, 2016; Holmes *et al.*, 2012, 2014; Turner et Lau, 2016) sont retrouvés à la surface des MP présents dans l'environnement.

Des travaux ont étudié l'accumulation et les effets des POP via l'ingestion de MP chez les organismes marins (Avio *et al.*, 2015b; Besseling *et al.*, 2013; Frydkjær *et al.*, 2017; Herzke *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2013; Paul-Pont *et al.*, 2016; Rochman *et al.*, 2013). Dans une étude réalisée par Bakir *et al.* (2014), il a été montré que le passage dans des conditions intestinales simulées (c'est-à-dire surfactant digestif) accélère la désorption de POP adsorbés sur des MP de PVC et de PE et que cette désorption est plus rapide avec une augmentation de la température d'incubation. Ce travail démontre la possibilité d'un transport de ces POP adsorbés via l'ingestion des plastiques. L'accumulation de POP via l'ingestion de plastiques a été démontrée pour la moule (Avio *et al.*, 2015b; Paul-Pont *et al.*, 2016), l'arénicole (*Arenicola marina*) (Besseling *et al.*, 2013) et chez plusieurs espèces de poissons (Oliveira *et al.*, 2013; Rochman *et al.*, 2013). Dans certains cas, les POP adsorbés à la surface des MP peuvent entraîner quelques réponses physiologiques. Lors de l'exposition de juvéniles de gobie (*Pomatoschistus microps*) à du pyrène en présence ou non de microbilles de PE, la biodisponibilité du pyrène est augmentée par les MP présents pour les gobies et l'activité de l'acétylcholinestérase est inhibée en présence de MP seuls (Oliveira *et al.*, 2013). Néanmoins, plusieurs études (Besseling *et al.*, 2017; Frydkjær *et al.*, 2017; Herzke *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2016) ont mis en évidence que les MP n'étaient pas des vecteurs majoritaires de POP vers les organismes et la contribution des MP comme vecteurs de POP vers les organismes a certainement été surestimée. En effet, l'accumulation de fluoranthène associée à la présence ou non de microbilles en PS n'est pas modifiée chez la moule (Paul-Pont *et al.*, 2016). Il a été estimé récemment que l'adsorption du phénanthrène sur des MP de PE est plus faible qu'avec du phytoplancton, de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et des bactéries (*Vibrio fischeri*) (Frydkjær *et al.*, 2017). Une autre étude en laboratoire utilisant des conditions environnementales réalistes a démontré que les MP (PE) ne sont pas des vecteurs de PCB vers

l'arénicole (*A. marina*), ce qui a été ensuite confirmé par un modèle biodynamique (Besseling *et al.*, 2017). Une étude, *in situ*, sur l'ingestion de MP chez le fulmar boréal (*Fulmarus glacialis*) a montré que la concentration de POP dans le muscle des oiseaux ne varie pas en fonction de la quantité de plastique ingérée (Herzke *et al.*, 2016). Ces résultats expérimentaux ou obtenus *in situ* ont largement été confirmés par des études de modélisation. Des études récentes ont montré, en utilisant des modèles prédictifs, que les MP via leurs ingestions ne sont pas des vecteurs contribuant à l'accumulation des POP chez les organismes (Bakir *et al.*, 2016; Beckingham et Ghosh, 2017; Gouin *et al.*, 2011; Koelmans *et al.*, 2013a, b; Koelmans *et al.*, 2016). Ceci est dû à (i) la contamination de base aux POP dans le milieu et les organismes marins et (ii) au faible nombre de MP par rapport aux autres particules en suspension dans les océans.

Le rôle des microplastiques comme vecteur significatif de POP vers les organismes marins est certainement modeste (Bakir *et al.*, 2016; Beckingham et Ghosh, 2017; Besseling *et al.*, 2017; Frydkjær *et al.*, 2017; Gouin *et al.*, 2011; Herzke *et al.*, 2016; Koelmans *et al.*, 2013a, b; Koelmans *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2016). L'effet inverse pourrait même être observé, c'est-à-dire que le MP va dépurifier l'organisme, dans certaines modélisations (Koelmans *et al.*, 2016). Néanmoins, ceci n'est probablement pas vrai pour les additifs plastiques, qui sont introduits de manière volontaire dans les polymères et qui sont pour certains additifs, source de ces polluants dans les milieux (Al-Odaini *et al.*, 2015). Moins d'études ont été réalisées sur ces additifs plastiques malgré le fait que certains soient reconnus comme dangereux pour les organismes et l'Homme (Lithner *et al.*, 2011).

II.4.4.2 Additifs plastiques

Cette partie décrivant l'occurrence des additifs plastiques dans l'environnement et leurs impacts sur les organismes a été valorisée à travers une revue bibliographique (**Article 1**) publiée dans le journal *Chemosphere* (Annexe 1, page 298):

Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. *Chemosphere*. 182, 781-793. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.096>

Les matériaux plastiques sont créés par la polymérisation de monomères et d'autres substances incluant les additifs plastiques (Lithner *et al.*, 2011). Ces derniers sont des produits

chimiques qui confèrent des propriétés désirées aux polymères plastiques ou qui sont incorporés afin de faciliter la fabrication de la matière plastique (OECD, 2004). Les additifs plastiques sont principalement utilisés comme plastifiants, retardateurs de flammes, stabilisants, antioxydants et pigments. En plus, des voies de contamination usuelles (eaux usées, dépôts atmosphériques, ruissellement ...), la lixiviation des additifs plastiques provenant des débris plastiques peut-être une source supplémentaire de ces produits au sein des océans et des environnements marins. La lixiviation des additifs plastiques hors de la matrice polymérique est possible car la majorité de ces additifs n'est pas chimiquement liée aux polymères. Les phtalates, le bisphénol A (BPA), les retardateurs de flammes bromés (RFB) et les nonylphenols sont les additifs plastiques les plus retrouvés dans l'environnement marin (Bergé *et al.*, 2012, 2013; David *et al.*, 2009; Net *et al.*, 2015).

Les RFB sont une classe d'additifs plastiques utilisée dans les matériaux plastiques afin de diminuer la propagation des flammes en cas de combustion. Cette classe de retardateur de flamme inclut un grand nombre de produits chimiques, notamment les PBDE, l'hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA) qui sont utilisés actuellement par l'industrie plastique. Les phtalates sont utilisés comme plastifiants, majoritairement dans le PVC qui peut contenir entre 10 et 60% de phtalates (Net *et al.*, 2015). Le BPA est le produit chimique majoritaire du groupe des bisphénols. Ce produit chimique est utilisé, principalement, comme monomère du PC et des résines époxy et aussi comme additif plastique, plastifiant ou antioxydant, dans le PE et le PP (Crain *et al.*, 2007; Rani *et al.*, 2015). Les nonylphenols sont, quant à eux, principalement utilisés comme antioxydant et plastifiant pour la production d'un grand nombre de polymères plastiques (Rani *et al.*, 2015).

Les additifs plastiques ont été retrouvés dans tous les océans, ainsi que dans les sédiments et les organismes marins. Récemment, l'étude des MP retrouvés dans l'environnement marin a permis de mettre en évidence la présence de ces produits chimiques (RFB, phtalates, BPA, nonylphenol, etc) dans ces microparticules de plastiques (Faure *et al.*, 2015; Fries *et al.*, 2013; Hirai *et al.*, 2011; Mato *et al.*, 2001; Rani *et al.*, 2015; Rochman *et al.*, 2014). Dans certains cas, la présence de plastiques est la source majoritaire d'additifs plastiques dans l'environnement. Ce fut notamment le cas, dans une étude sur la présence de HBCD dans les sédiments d'une baie sud-coréenne (Al-Odaini *et al.*, 2015). Dans cette baie, les bouées en polystyrène expansé (PSe) utilisées en aquaculture étaient la source principale d'HBCD dans les sédiments (Al-Odaini *et al.*, 2015). La lixiviation d'additifs plastiques dans le milieu marin constitue un risque émergent, notamment si l'on s'intéresse aux MP. En effet, de par leurs petites tailles (<5 mm) et la quantité importante dans le milieu, ils peuvent être

ingérés par tous les organismes et la lixiviation peut aussi avoir lieu lors de l'ingestion de ces particules.

Le transfert de ces additifs plastiques via l'ingestion de MP a été décrit dans quelques études en laboratoire et en milieu naturel. Les études en laboratoires (Bakir *et al.*, 2014; Browne *et al.*, 2013; Chua *et al.*, 2014; Gaylor *et al.*, 2012; Rochman *et al.*, 2013; Wardrop *et al.*, 2016) ont démontré le transfert des additifs plastiques aux organismes avec dans certains cas des effets toxiques et des changements comportementaux. Une des études conduites en milieu naturel (Tanaka *et al.*, 2013) a mis en évidence le transfert de PBDE suite à l'ingestion de plastique chez le puffin à bec grêle (*Puffinus tenuirostris*) et un transfert plus important *via* les plastiques que par le bol alimentaire (Tanaka *et al.*, 2015). De plus, certains additifs plastiques comme le congénère bromodiphényléther-209 (BDE-209) et le diethylhexyl phtalate (DEHP) sont utilisés comme marqueur de l'ingestion de plastiques (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014; Fossi *et al.*, 2016; Rochman *et al.*, 2014).

La toxicité des plastiques a beaucoup été étudiée dernièrement mais peu d'études ont été réalisées sur la toxicité chimique de ces particules. Néanmoins, des études basées sur les processus de lixiviation des additifs hors de la matrice polymérique ont été réalisées récemment. Ces études mettent en évidence la toxicité des lixiviats sur les organismes étudiés. Les effets dus à ces produits chimiques dangereux sont multiples : diminution de la survie et de la probabilité de fixation pour la larve de bernacle, mortalité chez plusieurs espèces de copépodes et mortalité et augmentation de malformations embryonnaires chez la moule *Perna perna* (Bejgarn *et al.*, 2015; Gandara e Silva *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a; Lithner *et al.*, 2012). Il convient de noter que ces expériences ont été réalisées en étudiant spécifiquement certains additifs et un travail de criblage non ciblé est nécessaire afin d'identifier le(s) composé(s) responsable(s) de la toxicité.

Jusqu'à présent, la plupart des études de modélisation ont concentré leur travail sur les composés organiques hydrophobes (HOC) adsorbés (Bakir *et al.*, 2016; Koelmans *et al.*, 2016). En revanche, seul un modèle est disponible concernant le transport et le devenir des additifs plastiques lixiviés à partir de débris plastiques (Koelmans *et al.*, 2014). De nouvelles modélisations sont d'autant plus nécessaires sachant que (i) les additifs plastiques peuvent être ajoutés à une concentration très élevée selon l'application et (ii) le transfert d'additifs plastiques à l'organisme marin après ingestion de plastique a été démontré à la fois par des expériences de laboratoire et par des études sur le terrain. Il sera donc nécessaire d'inclure ces produits chimiques dans les futurs travaux de modélisation afin de mieux clarifier leur potentiel de transfert et de toxicité.

Des nouvelles études expérimentales et de modélisation sont nécessaires pour mieux caractériser (i) le transfert des additifs plastiques via l'ingestion de plastique en comparaison au transfert de ces additifs via la nourriture et (ii) l'effet des additifs plastiques sur les organismes.

III Méthodes de détection et de caractérisation des microplastiques dans les produits de la pêche

III.1 Détection des microplastiques

Afin de mieux appréhender le danger lié aux MP pour le consommateur de produits de la pêche, il est nécessaire de mieux estimer la contamination de ces produits. Ceci passe par le développement et l'utilisation de méthodes permettant (i) de détecter et (ii) de caractériser d'un point de vue chimique les polymères plastiques. Néanmoins, actuellement aucune méthode standardisée pour la détection des MP, dans les organismes aquatiques consommés, n'est disponible malgré la demande des institutions ([Directive Strategy Framework, 2013](#); [European Commission, 2010](#); [OSPAR, 2015](#)).

Après dissection des organismes considérés et récupération des tissus d'intérêts, les organismes sont couramment conservés à -20°C, dans du formaldéhyde ou dans de l'éthanol ([Miller et al., 2017](#); [Wesch et al., 2016](#)).

La première approche pour détecter les MP contaminant les organismes est l'observation visuelle des tissus sous loupe binoculaire ([Choy et Drazen, 2013](#); [Güven et al., 2017](#); [Murphy et al., 2017](#); [Ramos et al., 2012](#); [Romeo et al., 2015](#); [Taylor et al., 2016](#); [Vendel et al., 2017](#)). Cette approche reste néanmoins très limitée car il est fort probable que des MP soient retenus dans les tissus et qu'ils ne soient pas détectés ([Miller et al., 2017](#)) menant à une sous-estimation de la contamination.

La digestion des tissus d'intérêts par des solutions enzymatiques ou chimiques (acides, bases, oxydants) peut se faire avant l'étape d'observation visuelle afin d'éliminer un maximum de matière organique. Il faut toutefois utiliser une solution qui n'affecte pas l'intégrité des MP et qui permette ensuite de pouvoir caractériser la forme, la taille, la couleur et le polymère des MP récupérés. Plusieurs études ont eu pour but d'identifier une solution qui permettrait la digestion de divers tissus (bivalve entier, muscle et tractus gastro-intestinal (TGI) de poisson) sans dégrader plusieurs polymères plastiques communément rencontrés (Tableau 5).

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes études ayant été réalisées pour trouver une solution digérant les tissus des produits de la pêche sans dégrader les polymères plastiques les plus répandus.

Traitement	Paramètres de digestion	Organismes digérés	% d'efficacité de digestion (\pm S.D)	Polymères testés	Effet sur polymère	Réf
Enzyme						
Trypsin 0,3125%	38-42°C, 30min	Moule	88 \pm 2,52	PET, PE, PP, PS, PA et PVC	Non	[1]
Corolase 7089 0,5% (v/v)	60°C, 12h	Moule	100	PET, PEHD, PVC, PA	Non ¹	[2]
Acide						
HNO ₃ 35% (v/v)	60°C, 12h	Moule	100	PET, PEHD, PVC, PA	Oui : PET, PEHD et PA	[2]
HNO ₃ 55% (v/v)	80°C, 30 min	Poisson juvénile (entier)	100 ³	PE, Nylon, PET, PVC, PS	Oui : PA	[11]
HNO ₃ 65% (m/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	99,545 \pm 0,010	n.r	n.r	[5]
HNO ₃ 65% (m/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h	Moule	99,575 \pm 0,025	PP, PE, PVC	Oui : Tous	[5]
HNO ₃ 69%	25°C, 96h			PEHD, PEHD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PA, PVC	[8]
HNO ₃ 32,6 M	60°C, 24h	Moule	99,52 – 99,65	n.r	n.r	[6]
HNO ₃ 32,6 M	60°C, 1h puis 100°C, 1h	Moule	99,74 – 99,85	PS, PA	Oui : PA	[6]
HNO ₃ 22,5 M	20°C, 12h puis 100°C, 30 min puis dilution	Poisson (TGI)	n.r	n.r	n.r	[7]
HNO ₃ 65% (m/v)/HClO ₄ 70% (m/v) (4/1, v/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	98,528 \pm 0,636	n.r	n.r	[4]
HNO ₃ 65% (m/v)/HCl 37% (m/v) (3:1, v/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	99,088 \pm 0,264	n.r	n.r	[4]
HNO ₃ 32,6 M /HCl 32,3 M (3:1, v/v)	60°C, 24h	Moule	98,38 – 98,78	n.r	n.r	[6]
HNO ₃ 32,6 M /HCl 32,3 M (3:1, v/v)	60°C, 1h puis 100°C, 1h	Moule	98,90 – 99,11	n.r	n.r	[6]
HNO ₃ 65% (m/v)/H ₂ O ₂ 30% (m/v) (3:1, v/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	97,207 \pm 0,466	n.r	n.r	[5]
HNO ₃ 32,6 M /H ₂ O ₂ 36,2	60°C, 24h	Moule	0	n.r	n.r	[6]

Traitement	Paramètres de digestion	Organismes digérés	% d'efficacité de digestion (\pm S.D)	Polymères testés	Effet sur polymère	Réf
M (3:1, v/v)						
HNO ₃ 32,6 M /H ₂ O ₂ 36,2 M (3:1, v/v)	60°C, 1h puis 100°C, 1h	Moule	0	n.r	n.r	[6]
HNO ₃ 69%/HClO ₄ 70% (4:1, v/v)	5h 20°C puis 10 min à 80°C	n.r	n.r	PP, PEBD, PEHD, ABS, PUR, PSe, PA, ABS, EVA, PET, PVC, PMMA, PFTE	Oui : PA, PUR, ABS, PMMA et PVC	[10]
HCl 37%	25°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	99,8 \pm 0,16 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PA, PVC	[8]
Base						
NaOH 1 M	60°C, 12h	Moule	100	PET, PEHD, PVC, PA	Non ¹	[2]
NaOH 52,5 M	60°C, 24h	Moule	95,95 – 99,48	n.r	n.r	[6]
NaOH 52,5 M	60°C, 1h puis 100°C, 1h	Moule	99,36 – 99,54	n.r	n.r	[6]
NaOH 30% (m/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	98,043 \pm 0,147	n.r	n.r	[5]
NaOH 1 M/SDS 5% (m/v) (2:1, v/v) puis H ₂ O ₂ 30% ou HCl 2 M	50°C, 48h	Poisson (TGI)	n.r	PEHD, PC et PET	Oui : PET	[12]
KOH 10%	20°C, 3 semaines	Poisson (TGI)	-	-	Non ²	[3]
KOH 10% (m/v)	20°C, 24h puis 80°C, 2h puis dilution à 80°C	Moule	99,775 \pm 0,009	n.r	n.r	[4]
KOH 10% (m/v)	60°C pendant 24h	Moule	99,936 \pm 0,015	PP, PE, PVC	Non ¹	[5]
KOH 10% (m/v)	25°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	97,1 \pm 1,28 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PVC	[8]
KOH 10% (m/v)	40°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	98,6 \pm 0,05 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Non	[8]
KOH 10% (m/v)	50°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	98,9 \pm 0,33 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PVC, PET	[8]
KOH 10% (m/v)	60°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	97,61 \pm 0,17 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PVC, PET	[8]
KOH 1 M	20°C, 48h	Poisson (TGI et entier)	100 ³	PEHD, PEBD, PC, PC, PA, ABS, PBT, PET, PP, SAN,	Oui : AC, PLA	[4]

Traitement	Paramètres de digestion	Organismes digérés	% d'efficacité de digestion (\pm S.D)	Polymères testés	Effet sur polymère	Réf
KOH 30%/NaClO ₄ (1:1, v/v)	15 min d'ultrasonication puis 2h d'agitation	Poisson (TGI)	100 ³	EVA, PLA, AC PP, PEBD, PEHD, ABS, PUR, PSe, PA, ABS, EVA, PET, PVC, PMMA, PFTE	Non	[10]
Oxydant						
H ₂ O ₂ 32,6M	60°C, 24h	Moule	98,51 – 98,57	n.r	n.r	[6]
H ₂ O ₂ 32,6M	60°C, 1h puis 100°C, 1h	Moule	98,65 – 99,55	n.r	n.r	[7]
H ₂ O ₂ 15%	Décantation NaCl puis 50°C, 12h	Poisson (TGI)	n.r	PE, PS	Non ¹	[7]
H ₂ O ₂ 30%	55°C, 7 jours puis dilution	Poisson (TGI)	n.r	n.r	n.r	[7]
H ₂ O ₂ 35%	60°C, 96h	Juvéniles entiers (chair+peau)	100 \pm 0,26 (IC95%)	PEHD, PEBD, PP, PVC, PET, PS, PA	Oui : PA, PVC	[8]
NaClO 9%	20°C, 12h puis rinçage au NHO ₃ 65% et sonification puis centrifugation	Poisson (TGI)	n.r	PE, PET, PVC, PP, PS, PC, PA	Oui : PVC	[9]

¹ : Récupération d'un nombre de MP > 80% après digestion. Pas d'observations réelles de l'intégrité des MP utilisés ; ² : Communication personnelle, pas d'informations dans la référence ; ³ : Pas d'efficacité calculé mais mention d'une digestion complète

TGI : Tractus gastro-intestinal ; IC95% : Intervalle de confiance à 95% ; n.r : non réalisé

ABS : Acrylonitrile butadiène styrène ; EVA : Éthylène-acétate de vinyle ; PA : Polyamide ; PBT : Poly- β -hydroxybutyrate ; PC : Polycarbonate ; PLA : Acide polylactique ; PE : Polyéthylène ; PEBD : Polyéthylène basse densité ; PEHD : Polyéthylène haute densité ; PET : Poly(téréphtalate d'éthylène) ; PFTE : Polytétrafluoroéthylène ; PMMA : Polyméthacrylate de méthyle ; PP : Polypropylène ; PS : Polystyrène ; PSe : Polystyrène expansé ; PUR : Polyuréthane ; PVC : Polychlorure de vinyle ; uPVC : Polychlorure de vinyle non plastifié ; SAN : Styrène-acrylonitrile

[1] Courtene-Jones *et al.* (2017) ; [2] Catarino *et al.* (2017) ; [3] Foekema *et al.* (2013) ; [4] Kühn *et al.* (2017) ; [5] Phuong *et al.* (2018b) ; [6] Claessens *et al.* (2013) ; [7] Avio *et al.* (2015a) ; [8] Karami *et al.* (2017c) ; [9] Collard *et al.* (2015) ; [10] Enders *et al.* (2017) ; [11] Naidoo *et al.* (2017) ; [12] Budimir *et al.* (2018)

À ce jour, les enzymes ont été utilisées avec succès pour réaliser des digestions avec des moules sans dégrader différents polymères plastiques (Catarino *et al.*, 2017; Courtene-Jones *et al.*, 2017). Néanmoins, ces enzymes n'ont jamais été testées pour la digestion de muscles ou de TGI de poissons. Mais cette possibilité semble peu adaptée car il a déjà été montré que la pepsine digère mal les muscles de poissons (Llarena-Reino *et al.*, 2013). Dans une approche utilisant une digestion au SDS puis des enzymes (protéase, lipase, cellulase, amylase et chitinase) et enfin du H₂O₂, Löder *et al.* (2017) ont montré que cette méthode était applicable sur des échantillons très variés (eau douce, sédiments, boues d'épuration et organismes). Cependant cette méthode nécessite des digestions successives pendant 11 à 14 jours (Löder *et al.*, 2017), ce qui représente un temps et un coût trop important pour des études à grandes échelles (Li *et al.*, 2018b).

Les acides (HCl et HNO₃) ont souvent été utilisés pour la digestion des tissus des produits de la pêche (Santana *et al.*, 2016; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015) mais ces produits altèrent fortement les plastiques de type Polyamide (PA) ainsi que d'autres polymères comme le PET, le PE et le PVC par exemple (Catarino *et al.*, 2017; Claessens *et al.*, 2013; Enders *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017c; Naidoo *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b; Roch et Brinker, 2017). Les protocoles utilisant donc des acides comme solutions digérant les tissus sont à proscrire car ceci peut entraîner une sous-estimation de la contamination des organismes aux MP.

Concernant les bases, le NaOH a démontré une bonne efficacité de digestion (> 95%) (Catarino *et al.*, 2017; Claessens *et al.*, 2013; Phuong *et al.*, 2018b) mais ce produit chimique dégrade le PET (Budimir *et al.*, 2018). Ceci ne permet pas de considérer cette base comme une solution adaptée à la problématique. Le KOH, une autre base, a souvent été utilisé à une concentration de 10% poids/poids (p/p) permettant de digérer les bivalves ainsi que les muscles et les TGI de poissons sans dégrader la majorité des polymères (Enders *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b). Le KOH 10% dégrade tout de même le CA ainsi que l'acide polylactique (PLA). Néanmoins, ceci est peu problématique car le CA n'est jamais retrouvé dans l'environnement marin même s'il est largement utilisé dans les filtres de cigarettes (Puls *et al.*, 2011). Le PLA est un polymère bio-dégradable et ne représente que 212 000 tonnes produites en 2016, ce qui est très peu en comparaison avec la production de polymères pétro-sourcés (European Bioplastics, 2017).

Pour les oxydants, la majorité des études ont utilisé l'eau oxygénée H₂O₂. Quand l'efficacité de digestion avec ce produit est supérieure à 95%, l'eau oxygénée va dégrader le PA et le PVC (Karami *et al.*, 2017c) ce qui peut mener à une sous-estimation de la

contamination. Il est aussi nécessaire de prendre quelques précautions concernant la température d'incubation de ces solutions. En effet, les travaux de [Munno *et al.* \(2018\)](#) ont montré que des températures d'incubations supérieures à 60°C peuvent faire fondre certains polymères dont le PE qui est très répandu ([PlasticsEurope, 2016](#)). De plus, l'H₂O₂ est un produit instable dans le temps ce qui peut conduire à des problèmes de reproductibilité d'analyses.

Récemment, [Wagner *et al.* \(2017\)](#) ont proposé une méthode d'extraction des MP des tractus gastro-intestinaux des poissons utilisant la Pulsed Ultrasonic Extraction (PUE). Cette technique permet d'extraire les MP sans avoir à recourir à l'utilisation de produits chimiques qui peuvent dégrader les polymères. De plus, cette technique, en comparaison avec une extraction utilisant le KOH 10%, ne laisse pas de résidus sur les particules permettant une identification aisée en spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) et cette méthode permet d'isoler les MP en 1h seulement ([Wagner *et al.*, 2017](#)). Par contre, il faut veiller à ce que des particules de grandes tailles ne se fragmentent pas en plusieurs petits morceaux.

Afin de standardiser les méthodes de digestion des produits de la pêche entre les différentes équipes, il serait intéressant que les développements méthodologiques se réalisent avec les mêmes espèces aquatiques et que les paramètres à étudier (% d'efficacité de digestion, impact du produit chimique sur différents polymères, etc.) soient identiques, afin de pouvoir comparer les résultats. De plus, il est nécessaire de donner une gamme de poids pour laquelle le protocole est valide comme cela a été réalisé par [Budimir *et al.* \(2018\)](#). En effet, les auteurs indiquent que si le poids des tubes digestifs de poisson digérés avec leur méthode est supérieur à 10 g, il est nécessaire de digérer seulement le contenu stomacale ([Budimir *et al.*, 2018](#)).

Après la digestion des tissus des produits de la pêche, un grand nombre d'études a isolé manuellement les MP sur les filtres obtenus ([Lusher *et al.*, 2013](#); [Rochman *et al.*, 2015b](#); [Van Cauwenberghe et Janssen, 2014](#); [Vandermeersch *et al.*, 2015a](#)). L'isolement manuel en vue de la caractérisation peut-être facilité en utilisant la coloration au Rouge de Nil ([Maes *et al.*, 2017](#); [Shim *et al.*, 2016](#)). La coloration au Rouge de Nil permet de colorer les MP sans colorer d'autres débris (sable, chitine, bois ...) pouvant interférer avec l'analyse ([Erni-Cassola *et al.*, 2017](#); [Maes *et al.*, 2017](#)). Cette technique a été appliquée à des échantillons environnementaux d'eau de mer ([Erni-Cassola *et al.*, 2017](#)) et de sédiments ([Maes *et al.*, 2017](#)). De plus, la coloration n'interfère pas avec une identification des polymères en FTIR et en Raman ([Erni-Cassola *et al.*, 2017](#); [Maes *et al.*, 2017](#); [Shim *et al.*, 2016](#)).

III.2 Caractérisation chimique des microplastiques

Après avoir isolé et détecté les potentiels MP contaminant les divers produits de la pêche, il est nécessaire de confirmer ou non la nature synthétique de ces particules. Cette étape de vérification de la nature polymérique des particules rencontrées est obligatoire afin de ne pas surestimer les niveaux de contamination. A ce jour, sur les 54 études traitant de la contamination des produits de la pêche (Tableau 3 et Tableau 4), 25 n'ont pas utilisé de méthode d'identification des polymères, 25 ont utilisé la spectroscopie FTIR et 4 ont utilisé la spectroscopie Raman. Globalement, seulement la moitié des études s'attache à identifier le type de polymère (Renner *et al.*, 2018).

Dans cette section, les principales méthodes d'identification seront présentées en soulignant leurs avantages et inconvénients (Tableau 6) dans le domaine de la recherche de MP dans les produits de la pêche.

III.2.1 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une méthode non destructrice d'identification des structures externes d'une particule. Cette identification repose sur l'envoi d'un faisceau lumineux monochromatique (longueur d'onde : 500-800 nm) sur un échantillon. L'interaction entre ce faisceau lumineux et l'échantillon provoque une différence de fréquence de la lumière renvoyée dans le système d'analyse. Cette différence est appelée l'« effet Raman » qui est propre à chaque molécule (Löder et Gerdts, 2015). Comme les polymères de plastiques possèdent des spectres Raman spécifiques, l'identification est réalisée par comparaison à des spectres de référence.

La spectroscopie Raman a été utilisée afin d'identifier les familles de plastiques que ce soit dans les sédiments (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013), dans les océans (Enders *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2014) ou dans les organismes marins (Cole *et al.*, 2013; Goldstein et Goodwin, 2013; Murray et Cowie, 2011; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014). Une étude récente (Lenz *et al.*, 2015) a eu pour but de comparer l'identification visuelle des MP à celle réalisée en spectroscopie Raman. Les particules identifiées visuellement comme des MP ne sont en réalité des plastiques que dans 68% des cas. De plus, l'identification visuelle est possible avec des particules de plus grosse taille, de l'ordre du millimètre. Le succès de l'identification visuelle dépend essentiellement de la couleur des particules : les particules noires ou transparentes sont souvent peu identifiées par Raman comme étant du plastique. De plus, les pigments ajoutés comme additifs dans les plastiques peuvent masquer le signal du polymère (Imhof *et al.*, 2016; Oßmann *et al.*, 2018). Dans l'étude de Lenz *et al.* (2015), il a aussi été

montré que les additifs (dont les pigments) et le relief de la surface du plastique peuvent avoir une incidence sur l'identification des familles de plastiques pouvant aller jusqu'à une mauvaise identification. D'autres études ont eu pour but d'automatiser ou de semi-automatiser la détection puis l'identification des MP en utilisant la spectroscopie Raman (Frère *et al.*, 2016; Obmann *et al.*, 2017).

III.2.2 Spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR est une technique d'identification non destructive d'échantillons gazeux, solide ou liquide. Dans le cas de la spectroscopie FTIR, un faisceau infrarouge est envoyé vers l'échantillon et celui-ci va absorber certaines longueurs d'ondes et en laisser passer d'autres. Il va alors résulter un spectre qui est propre à chaque molécule (Löder et Gerdts, 2015). Comme les polymères de plastiques possèdent des spectres en FTIR spécifiques, l'identification est réalisée par comparaison à des spectres de références.

La technique d'identification des polymères de plastiques par FTIR est la plus couramment utilisée. Les polymères de plastiques ont été identifiés dans les sédiments (Claessens *et al.*, 2011; Naidoo *et al.*, 2015; Ng et Obbard, 2006; Thompson *et al.*, 2004; Woodall *et al.*, 2014), dans le milieu marin (Isobe *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2015a; Naidoo *et al.*, 2015; Ng et Obbard, 2006; Thompson *et al.*, 2004) et dans les organismes marins (Avio *et al.*, 2015a; Eriksson et Burton, 2003; Lusher *et al.*, 2013; Neves *et al.*, 2015; Rummel *et al.*, 2016). De plus, certaines études sur les milieux en eau douce utilisent aussi cette technique d'identification des polymères de plastiques (Biginagwa *et al.*, 2015; Mani *et al.*, 2015; Phillips et Bonner, 2015). Des études ont, comme en Raman, eu pour but d'automatiser la détection puis de l'identification des MP (Phuong *et al.*, 2018b; Primpke *et al.*, 2017).

III.2.3 Pyrolyse-GC/MS

La pyrolyse-chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Py-GC/MS) est utilisée pour caractériser la structure chimique de particules. La structure de ces particules est déterminée en utilisant la composition des produits de dégradation thermique obtenue sur le pyrogramme.

Dans un premier temps, l'échantillon est pyrolysé à de fortes températures (400-700°C) dans le module de pyrolyse. Cette pyrolyse rompt les liaisons covalentes des polymères et des produits de décompositions sont ainsi obtenus. Dans un second temps, ces produits de décomposition sont transférés vers la colonne de la chromatographie gazeuse (GC) qui les sépare. Et dans un dernier temps, le spectre de masse des produits de décomposition est acquis grâce à la spectrométrie de masse (MS) (Figure 13).

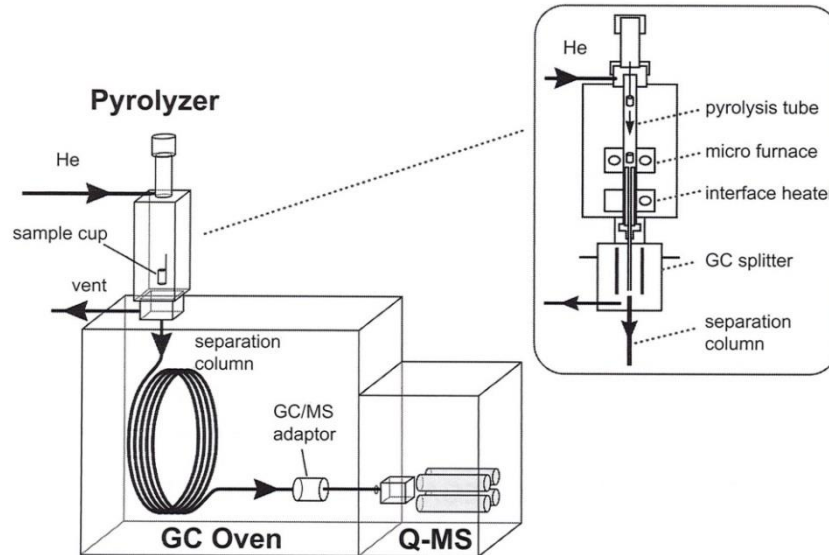


Figure 13 : Schéma d'un Pyrolyse-GC/MS. D'après Tsuge *et al.* (2011).

Un pyrogramme correspond au chromatogramme obtenu après pyrolyse, (Figure 14A) qui est associé à un spectre de masse global (Figure 14B), typique de chaque famille de plastique. L'identification est réalisée en comparant le spectre de masse moyen du pyrogramme à une bibliothèque de spectre de masse.

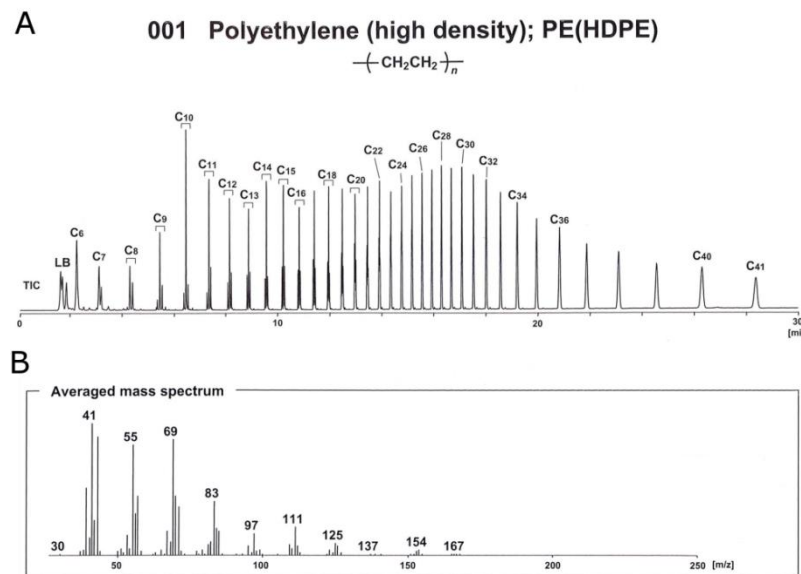


Figure 14 : (A) Pyrogramme de Polyéthylène haute densité (PEHD) ; (B) Spectre de masse moyen du Polyéthylène haute densité (PEHD). D'après Tsuge *et al.* (2011).

A ce jour, quelques études ont utilisé la Py-GC/MS pour identifier les familles de microplastiques présents dans les sédiments (Ceccarini *et al.*, 2018 ; Dekiff *et al.*, 2014; Fries *et al.*, 2013; Nuelle *et al.*, 2014), les organismes marins (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017), à la surface de lacs (Hendrickson *et al.*, 2018) ou à la surface de l'Océan (Ter Halle *et al.*, 2017). L'analyse des polymères de plastiques a été réalisée après une étape d'extraction et de

tri visuel des particules à partir de la matrice. Avant la pyrolyse, une étape de désorption thermique à plus faible température peut être effectuée permettant l'analyse des additifs présents sur le polymère (en fonction des marques des pyrolyseurs). Une étude très récente a utilisé la Py-GC/MS pour détecter des nanoplastiques dans des échantillons d'eau de mer provenant du gyre subtropical de l'Atlantique Nord (Ter Halle *et al.*, 2017). Cette détection ainsi que l'identification des polymères plastiques présents en mélange a été réalisée après une étape d'ultrafiltration, de Dynamic Light Scattering (DLS) et de lyophilisation. Ensuite un traitement du signal obtenu après Py-GC/MS a été effectué par chimométrie (Ter Halle *et al.*, 2017).

III.2.4 Autres méthodes de caractérisation des microplastiques

D'autres équipements et d'autres techniques permettent d'identifier les polymères plastiques et peuvent être utilisés pour l'identification des microplastiques. On trouve parmi ces méthodes : l'analyse thermogravimétrique réalisée sur phase solide couplée à un désorbeur thermique couplé à une GC/MS (TED-GC/MS), l'analyse thermogravimétrique couplée à la calorimétrie différentielle à balayage (TGA-DSC), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), l'analyse élémentaire couplée à spectrométrie de masse à ratio isotopique (EA-IRMS), la spectrométrie de masse à ionisation secondaire temps de vol (TOF-SIMS), et la SEM-EDS.

La TED-GC/MS et la TGA/DSC sont des méthodes qui utilisent l'analyse thermogravimétrique c'est à dire qui mesurent une évolution de masse d'un échantillon à une température donnée ou pour une augmentation de température au cours du temps. La technique de TED-GC/MS (Duemichen *et al.*, 2014) permet une identification spécifique des polymères testés, c'est-à-dire le PE, le PP, le PS, le PA-6 et le PET à l'aide des pics caractéristiques de chaque polymère obtenu après séparation en GC (Dümichen *et al.*, 2017). De plus, cette technique permet d'identifier les polymères dans des échantillons complexes sans prétraitements (Dümichen *et al.*, 2017; Dümichen *et al.*, 2015). L'étude utilisant la TGA-DSC (Majewsky *et al.*, 2016) a montré que cette technique permet d'identifier du PE et du PP dans des échantillons d'eaux usées. Néanmoins, cette technique ne permet pas d'identifier d'autres polymères que le PE et le PP car les pics de dégradation se superposent et ne permettent pas une identification non-équivoque (Majewsky *et al.*, 2016). Ces deux techniques thermogravimétriques permettent d'avoir des résultats quantitatifs après une étape de calibration avec des polymères de références et possèdent des temps d'analyses assez courts (\approx 2-3h par échantillon) (Dümichen *et al.*, 2015; Elert *et al.*, 2017; Majewsky *et al.*,

2016). Cependant, ces deux méthodes posent un problème majeur pour la recherche des MP dans des échantillons environnementaux : comme l'échantillon est introduit sans prétraitement, aucune information sur la taille, la forme et la couleur des potentiels plastiques n'est obtenue (Dümichen *et al.*, 2017; Dümichen *et al.*, 2015; Elert *et al.*, 2017; Majewsky *et al.*, 2016). Ceci est problématique pour la recherche de MP car la taille est actuellement le critère principal de classification.

L'analyse élémentaire couplée à spectrométrie de masse à ratio isotopique a été utilisée pour caractériser des polymères plastiques (Berto *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2010). L'EA/IRMS fournit des résultats d'abondance relative d'isotopes stables et dans le cas des plastiques, le ratio entre le ^{12}C et le ^{13}C est noté $\delta^{13}\text{C}$. Cette technique permet de différencier les particules d'origine pétrochimique de celles d'origine naturelle (plantes) mais ne permet pas de différencier les polymères entre eux (Berto *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2010). Comme les techniques TED-GC/MS et TGA-DSC, cette méthode est destructive car l'échantillon est pyrolysé à une forte température (900°C) (Berto *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2010) et elle ne permet donc pas de déterminer la taille des MP potentiels présents dans l'échantillon introduit dans l'appareil.

Une méthode de chromatographie liquide a été utilisée pour caractériser ou quantifier les MP dans différents types d'échantillons (Hintersteiner *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017a). Elle permet de mettre en évidence la présence de PC et de PET dans des échantillons de boues de station d'épuration (Wang *et al.*, 2017a). Dans leur étude, les auteurs (Wang *et al.*, 2017a) quantifient le PET et le PC dans les boues après une étape de dépolymérisation alcaline des plastiques et ne quantifient que les monomères : le bisphénol A (BPA) pour le PC et l'acide phtalique pour le PET. Cette technique repose donc sur une analyse indirecte de la quantité de polymère sans prendre en compte d'autres sources de BPA et d'acide phtalique dans les échantillons et ne permet pas d'analyser d'autres polymères. De plus, l'information de la taille est perdue car l'échantillon est introduit sans prétraitements ce qui est problématique comme mentionné précédemment.

La TOF-SIMS est une méthode de caractérisation de la surface des matériaux. En effet, un faisceau à impulsion d'ions est envoyé sur le matériau à analyser et il y a production d'ions secondaires qui sont caractéristiques du matériau analysé. Dans une étude réalisée par Jungnickel *et al.* (2016) cette technique a été utilisée pour caractériser la composition et la taille de particules de PE formées suite à sa dégradation par du sable et des conditions marines. Les auteurs montrent une augmentation du nombre de particules de PE produites au cours du temps avec des surfaces pouvant être de 1-1,4 μm^2 (Jungnickel *et al.*, 2016), ce qui

est très prometteur en terme analytique car la technique permet d'identifier des particules de très petites tailles. Néanmoins, les auteurs n'indiquent pas si cette technique est applicable pour des études de surveillance des MP dans l'environnement ou le biote marin et ils ne mentionnent pas si cette technique est utilisable pour d'autres polymères que le PE.

La SEM-EDS est une technique permettant d'obtenir des images haute résolution d'un objet couplé à son analyse élémentaire. Cette technique permet, à l'aide de la composition élémentaire, de distinguer entre un polymère synthétique et des particules inorganiques, comme par exemple des silicates d'aluminium (Eriksen *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2018). Dans une étude sur la présence de MP dans le tractus digestif de poisson de l'Océan Pacifique, il a été montré que la SEM-EDS permet de faire la différence entre les MP et des particules non synthétiques (Wang *et al.*, 2017b). Les auteurs (Wang *et al.*, 2017b) suggèrent que cette technique soit utilisée en amont de l'identification spectroscopique afin de trier les particules synthétiques des non synthétiques.

III.2.5 Avantages et inconvénients des principales techniques de caractérisation des microplastiques

La Py-GC/MS, la spectroscopie Raman et l'FTIR sont les trois techniques les plus utilisées pour identifier les polymères de plastiques dans le cadre de l'étude des microplastiques. Chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients (Tableau 6). L'identification des polymères de plastiques est une étape indispensable en vue de l'obtention de résultats fiables. En effet, l'identification visuelle seule des particules pouvant être des MP n'est pas fiable à 100% comme le montre Lenz *et al.* (2015). L'identification des polymères permet de confirmer que les particules considérées comme des MP sont vraiment des particules de plastique et surtout de connaître le type de polymère. Ceci donnant des résultats de prévalence fiable, que ce soit dans les sédiments, dans le milieu ou les organismes.

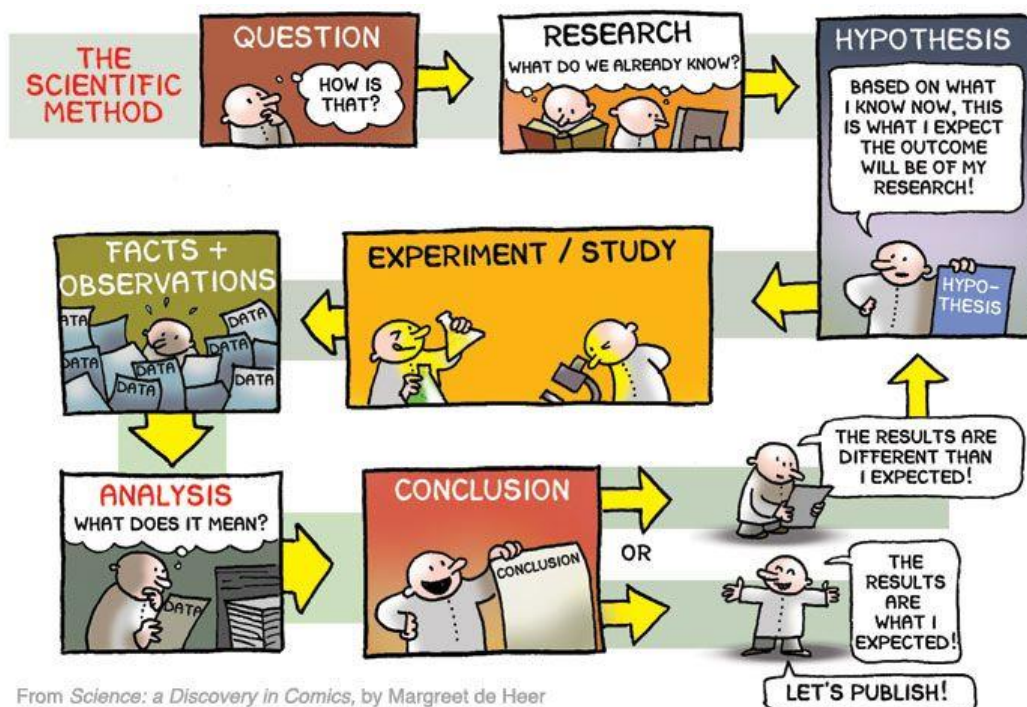
Néanmoins, il est important de noter, qu'aujourd'hui, un seul type de technique est utilisable directement sur les échantillons bruts : les analyses thermiques (Duemichen *et al.*, 2014; Dümichen *et al.*, 2017; Dümichen *et al.*, 2015; Elert *et al.*, 2017; Ter Halle *et al.*, 2017) et ouvre donc des possibilités quant à l'utilisation de la Py-GC/MS pour détecter et identifier les MP directement dans les matrices brutes même si cela empêche l'accès à la taille et la forme des MP. Actuellement, la majorité des travaux, réalisée pour caractériser les MP dans l'environnement et les organismes marins, nécessite une étape d'extraction/isolément.

Tableau 6 : Comparatif avec les avantages et les inconvénients des techniques les plus utilisées pour la caractérisation des MP dans les produits de la pêche.

	μ-Raman	μ-FTIR	Py-GC/MS
Taille limite d'identification (μm)	1	20	100 ¹
Avantages	Non destructif	Non destructif	Identification spécifique particule isolée
	Identification spécifique particule isolée	Identification spécifique particule isolée	Analyse additif possible (si désorption thermique)
	Facile à mettre en œuvre	Facile à mettre en œuvre	Automatisation (si échantillonneur automatique)
	Applicable sur petits échantillons	Rapide	Identification spécifique en mélange
	Rapide		Détection indirecte de nanoplastiques
Inconvénients	Décomposition échantillon par échauffement	Obligation de sécher les particules	Destructif
	Fluorescence de certaines particules	Difficulté d'identification des particules noires	
	Réactions photochimique		
	Emission du corps noir		
	Sensibilité au relief des particules		
	Difficulté d'identification des particules noires ou contenant des pigments		

¹ Taille limite d'identification d'une particule seule d'après [Nuelle et al. \(2014\)](#).

Chapitre 2 Développements méthodologiques



From *Science: a Discovery in Comics*, by Margreet de Heer

Préambule

La recherche de MP dans les différents compartiments de l'environnement marin incluant la surface, la colonne d'eau, les sédiments et le biote a mené à l'émergence d'une multitude de méthode pour échantillonner, extraire, quantifier puis identifier les MP dans ces différentes matrices. Au vu du nombre de méthodes différentes proposé depuis l'émergence de la thématique (Chapitre 1 - Tableau 5), il apparaît que chaque équipe de recherche possède sa propre méthode pour l'analyse des MP dans les organismes.

Malgré les demandes des institutions ([Directive Strategy Framework, 2013](#); [OSPAR, 2015](#)) et des revues de la littérature appelant à l'harmonisation des méthodes ([Lusher et al., 2017b](#); [Miller et al., 2017](#); [Wesch et al., 2016](#)), aucune méthode harmonisée n'existe pour quantifier et caractériser les MP dans les différentes matrices marines, incluant les organismes. Ce manque est problématique car il rend la comparaison entre les différentes études très complexe.

Dans ce contexte, un des premiers objectifs de ce travail a été de réaliser des développements méthodologiques pour extraire et identifier les MP présents dans les produits de la pêche. Dans un premier temps, une méthode pour extraire les MP des tissus des produits de la pêche sans dégrader les MP a été sélectionnée parmi des méthodes trouvées dans la littérature (**Article 2**)¹. Dans un deuxième temps, les limites d'applications de cette méthode ont été déterminées (**Article 3**)². Dans un dernier temps, une méthode d'identification des MP par Py-GC/MS a été optimisée, validée et appliquée sur des MP provenant de différentes matrices animales et environnementales (**Article 4**)³.

¹ Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*. 215, 223-233. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>

² Dehaut A., Hermabessiere L., Himber C., Paul-Pont I., Soudant P., Duflos G., in prep. Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method. *Environmental Pollution*.

³ Hermabessiere L., Himber C., Boricaud B., Kazour L., Amara R., Cassone A.-L., Laurentie M., Paul-Pont I., Soudant P., Dehaut A., Duflos G., accepted. Optimization, performance and application of a Pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 6663-6676. doi : <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1279-0>

I Sélection, optimisation et limites d'un protocole pour extraire les microplastiques des tissus des produits de la pêche

I.1 Sélection d'un protocole de digestion des tissus des produits de la pêche permettant la recherche des microplastiques

I.1.1 Introduction

Cette partie sur l'étude comparative de protocoles permettant l'extraction puis la caractérisation des MP présent dans les produits de la pêche a été valorisée à travers la publication d'un article scientifique dans le journal *Environmental Pollution* (**Article 2**) :

Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*. 215, 223-233. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>

Ce travail a été réalisé conjointement, entre le Laboratoire de l'environnement Marin (LEMAR), le laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM) de l'Ifremer de Brest, la Direction de l'Evaluation des Risques (DER) et le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSAI) – Département des produits de la pêche et de l'aquaculture de l'Anses dans le cadre du projet Convention de Recherche et Développement (CRD) Microplastiques (2015-CRD-11).

Les objectifs de ce travail étaient de tester (i) six protocoles déjà publiés sur 5 polymères de plastiques (PEBD, PEHD, PP, Polyamide 12 (PA-12), PS) (**Expérience 1**) (Figure 15), (ii) les effets de trois protocoles retenus sur 15 polymères (PEBD, PEHD, PP, PA-12, PA-6, PC, PET, PMMA, PFTE, PS, PSe, PSXL (Polystyrène cross-linked), uPVC, PUR, AC (Acétate de cellulose)) (**Expérience 2**) (Figure 15). Les effets des protocoles sur les plastiques ont été évalués en photographiant, pesant et identifiant les polymères par Py-GC/MS et spectroscopie μ -Raman avant et après application des protocoles. Pour finir, (iii) la digestion de tissus de produits de la pêche a été testée sur 3 organismes (moule, étrille, daurade grise) avec les deux protocoles retenus pendant l'expérience 2. En parallèle, la récupération de MP dans des tissus de produits de la pêche a été étudiée suite à l'enrichissement artificiel de matrice biologique (tube digestif et filet de poisson) avec des particules de PA-6 (**Expérience 3**) (Figure 15).

Ce projet initié au début de la thèse m'a permis de participer aux différentes expériences de ce travail. J'ai notamment contribué à la réalisation de l'expérience 1 ainsi qu'à l'expérience 2. Ma contribution a été de réaliser l'évaluation des effets des différents protocoles sur les 15 familles de plastiques en effectuant les mesures photographiques, de pesées et en procédant à l'identification des polymères par Py-GC/MS. De plus, j'ai réalisé l'enrichissement des matrices biologiques de l'expérience 3.

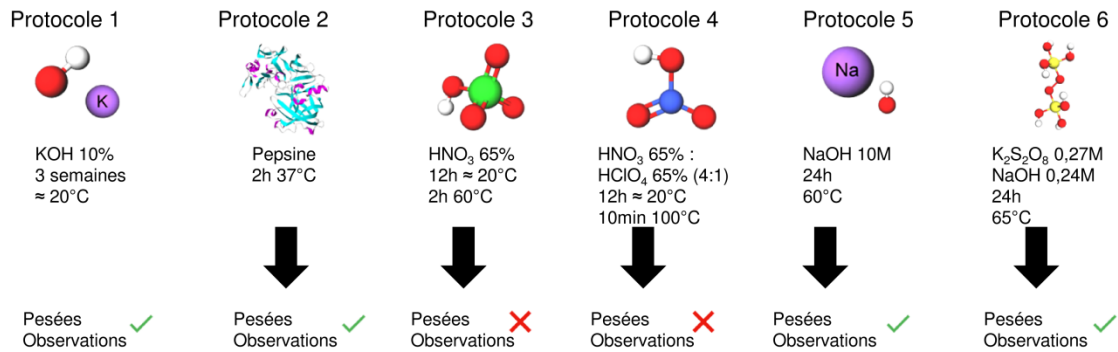
1.1.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 2

L'expérience 1 a montré que les protocoles 1, 5 et 6 pouvaient être utilisés pour l'expérience 2 car ceux-ci n'avaient pas d'effets délétères sur les polymères utilisés dans cette expérience. Néanmoins, les protocoles utilisant des acides (Protocole 3 : HNO₃ 65% et protocole 4 : HNO₃ 65% : HClO₄ 65 % (4:1 – v:v)) dégradent de manière importante le PA-12 et jaunissent d'autres polymères, notamment le PEBD. De plus, le protocole utilisant la pepsine n'a pas été conservé pour l'expérience 2, c'est-à-dire pour tester ce protocole sur 15 familles de plastiques, car la littérature a montré que la digestion des tissus de poisson est problématique avec cette enzyme.

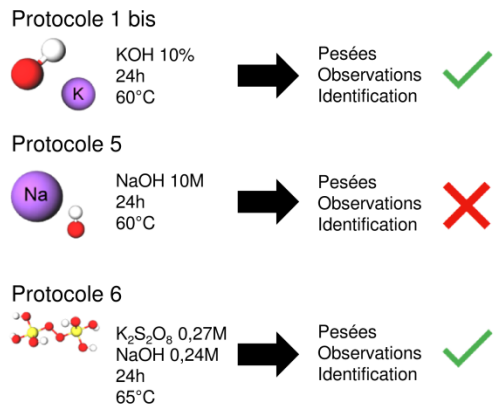
Les deux protocoles retenus pour l'expérience utilisaient l'hydroxyde de potassium (KOH) 10% et le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) 0,27 M : NaOH 0,24 M. Ces deux protocoles ne dégradaient pas les polymères plastiques, à l'exception de l'AC. De plus, ces deux protocoles n'altéraient pas les identifications obtenues en Py-GC/MS et en spectroscopie μ -Raman. L'expérience 2 a montré que le protocole utilisant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 10 M dissout totalement le PC et dégrade partiellement le PET et l'AC. Ce protocole n'a donc pas été retenu pour l'expérience 3.

L'expérience 3 a montré que le KOH 10% incubé à 60°C pendant 24h est le protocole qui digère le mieux les tissus des organismes marins sans dégrader 14 familles de polymères différentes (Figure 15). Le protocole KOH 10% est le meilleur compromis pour extraire et identifier les MP dans les produits de la pêche. Ce protocole devrait être mis en œuvre dans d'autres études de suivi pour assurer la pertinence et la comparaison des études sur les produits de la pêche.

Expérience 1 : Application de 6 protocoles sur 5 familles de plastiques



Expérience 2 : Application de 3 protocoles retenus sur 15 familles de plastiques



Expérience 3 : Digestion des tissus de produits de la pêche avec les 2 protocoles retenus

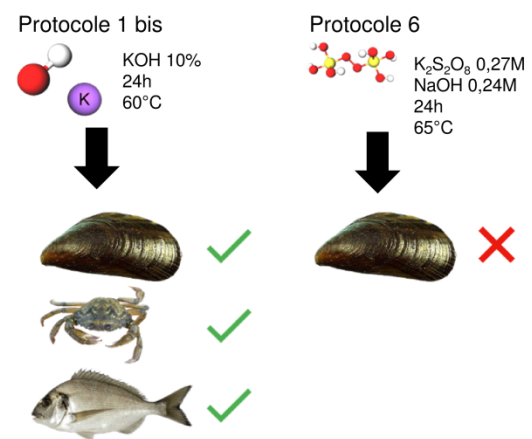


Figure 15 : Démarche expérimentale de l'analyse comparative de six protocoles en vue de l'extraction et de l'identification des MP des produits de la pêche.

1.1.3 Article 2 : Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization

Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization

Alexandre DEHAUT^a, Anne-Laure CASSONE^b, Laura FRERE^b, Ludovic HERMABESSIERE^a, Charlotte HIMBER^a, Emmanuel RINNERT^c, Gilles RIVIERE^d, Christophe LAMBERT^b, Philippe SOUDANT^b, Arnaud HUVET^c, 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'Évaluation 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.

* Corresponding author: ika.paulpont@univ-brest.fr

Graphical abstract



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 *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2004). Primary microplastics are referred to as microparticles produced as such, i.e. plastic pellets, exfoliating cosmetics or synthetic clothing fibres (Chang, 2015; Mato *et al.*, 2001; Napper *et al.*, 2015; van Wezel *et al.*, 2016), while secondary microplastics derive from the breakdown of larger plastic debris (Browne *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 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-Garcia *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2013; De Witte *et al.*,

2014; Lusher, 2015; Lusher *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2001; Sussarellu *et al.*, 2016; Tourinho *et al.*, 2010; Van Cauwenberghe *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2004; Van Cauwenberghe *et al.*, 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 (Van Cauwenberghe *et al.*, 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 (Avio *et al.*, 2015a; Nuelle *et al.*, 2014) 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.*, 2015a; 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 mm

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 et Janssen \(2014\)](#). Plastics were placed in 20 mL of a 65% nitric acid (HNO₃) 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% HNO₃ and 65% perchloric acid (HClO₄) 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 (K₂S₂O₈) (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 mm³) 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 \pm 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 μ m 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 ($d = 1.5\text{g/cm}^3$) 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 μ m. 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 24h 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 HNO₃ by one volume of HClO₄. Similarly, Claessens *et al.* (2013) observed a critical melting of PS particles directly exposed to HNO₃, 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.*, 2015b). Therefore, the use of HNO₃ 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.* (2015b), by reducing the incubation time to 24 h and increasing the incubation temperature to 60 °C (Protocol 1b).

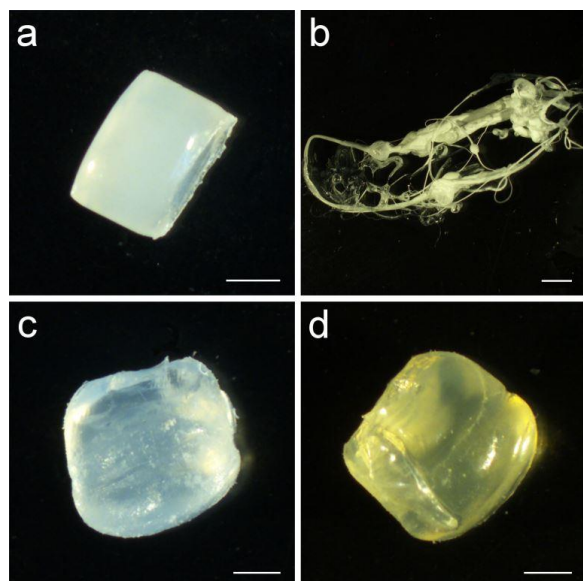


Fig 1. Microscopic observations of plastics treated with protocol 3 (65% HNO₃ at room temperature overnight, then 60 °C for 2 h). On the upper half: pictures of poly(lauryl lactam) (PA-12) before (a) and after (b) application of protocol. On the lower half: pictures of low density polyethylene (LDPE)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

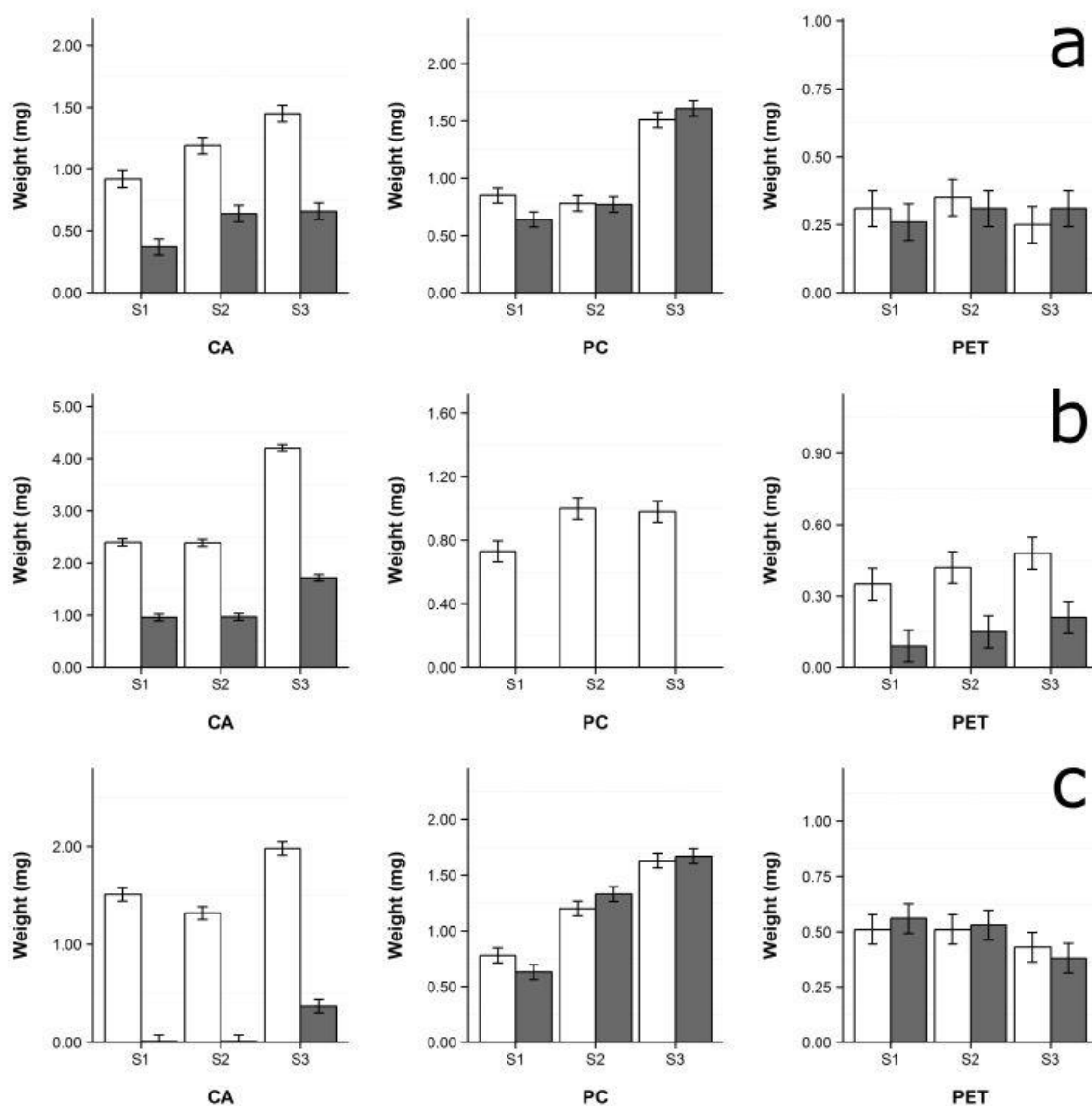


Fig 2. Bar chart representing evolution of weight (mg) for cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC) and polyethylene terephthalate (PET) before and after application of protocol 1b, 10% KOH, 24 h, 60 °C (a), protocol 5, 10M NaOH 60 °C, 24 h (b) and protocol 6 $K_2S_2O_8/NaOH$ 65 °C, 24 h (c). White 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.

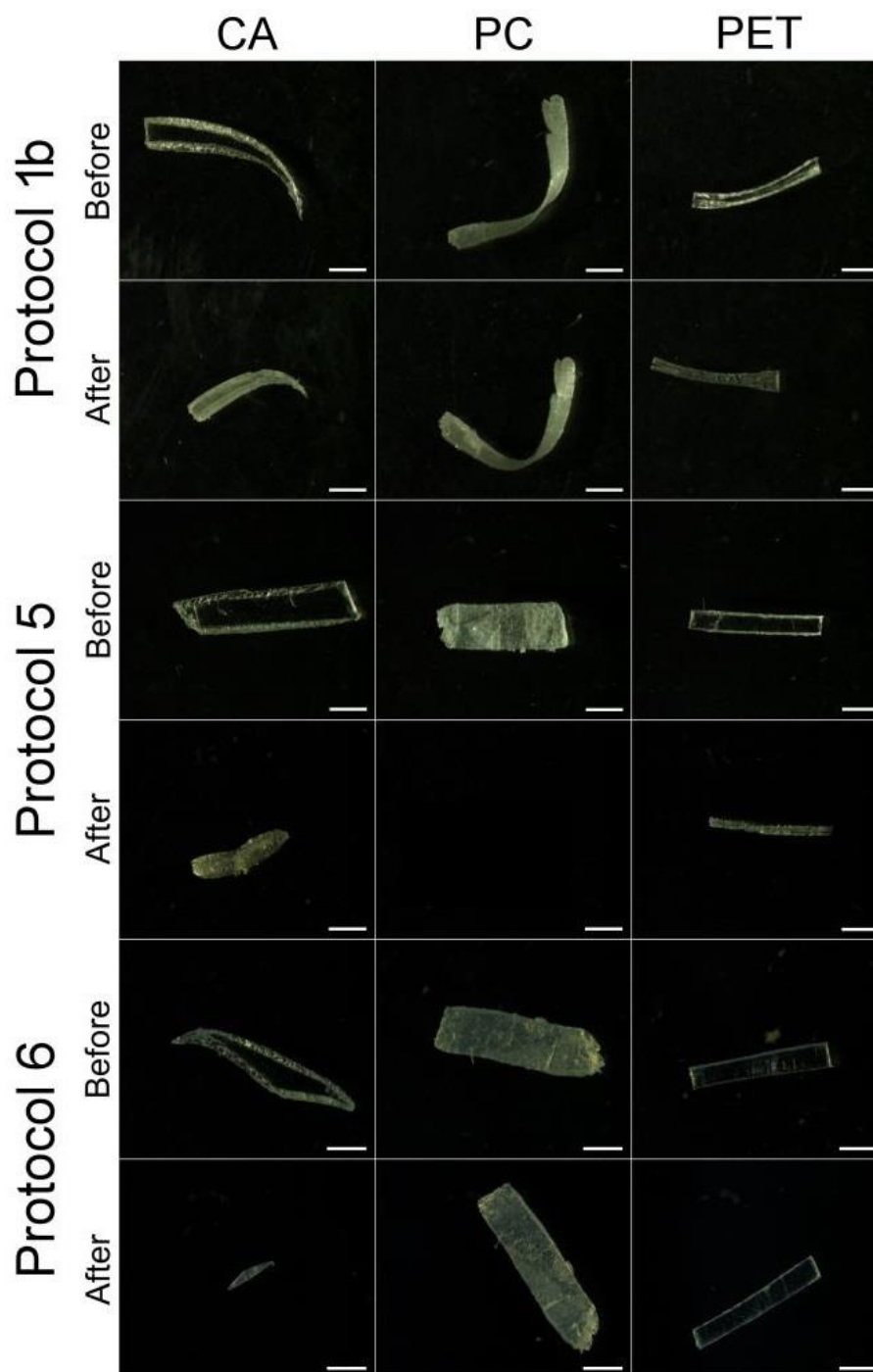


Fig 3. Pictures of the three types of polymers; cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC), polyethylene terephthalate (PET) mostly affected by protocols 1b (10% KOH, 24 h, 60 °C), 5 (10M NaOH 60 °C, 24 h) and 6 ($K_2S_2O_8/NaOH$ 65 °C, 24 h). For each protocol the picture of a single sample is presented before and after application of the protocol. White bars correspond to 1 mm.

3.2.3. Plastic identification

Regardless of which protocol was applied, it is noteworthy to mention that the Pyr-GC/MS and Raman micro-spectrometry methods allowed the identification of the native molecule for PE and PS, but it remained difficult to establish

differences between the subtype of polymers, i.e. LDPE vs. HDPE or ePS vs. PS vs. PSXL.

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.

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

Protocols	Analyses	uPVC	ePS	PUR	PTFE	PS	PP	PMMA	PET	PC	PA-6	PA-12	LDPE	HDPE	ePS	CA
1b	Weighing	✓	✓	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓*	NA	×
10% KOH	Visual	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Sh	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Sh, Si
(60°C, 24h)	Pyr-GC/MS	✓	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓#	✓#	×
	Raman	✓	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓#	✓#	×
5	Weighing	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	✓	✓	✓	✓	NA	×
10M NaOH	Visual	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Sh, Si	Sh, Si	✓	✓	✓	✓	✓	Sh, Si
(60°C, 24h)	Pyr-GC/MS	✓	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NA	✓	✓	✓#	✓#	✓#	×
	Raman	✓	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NA	✓	✓	✓#	✓#	✓#	✓
6	Weighing	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	NA	×
0.27M K ₂ S ₂ O ₈ / 0.24M NaOH	Visual	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Sh, Si
(65 °C, 24h)	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; rPS: reticulated 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 2 out of 3 analysis.																
“#”: only native molecule identified (not the type of polymerization).																
NA: not analysed because of technical issues.																

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.

3.2.4. Acquired knowledge

Protocol 1b (10% KOH, 24 h, 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, 24 h) 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 (K₂S₂O₈/ NaOH 65 °C, 24 h) 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 fibre glass filters (Table 2; Supplemental Fig. 5).

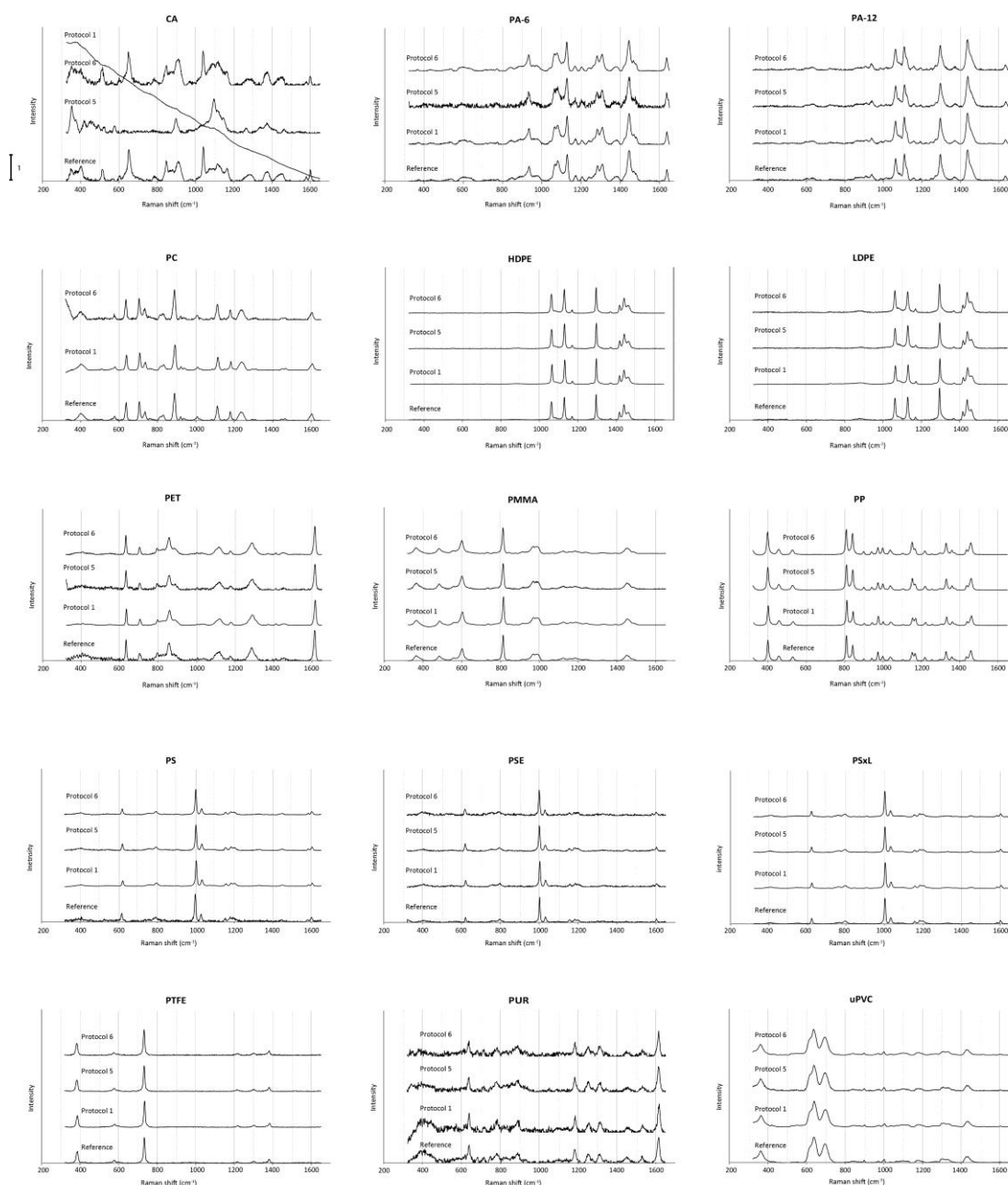


Fig 4. Raman spectra of the 15 polymers prior and after treatment by protocol 1b (10% KOH, 24 h, 60 °C), 5 (10M NaOH 60 °C, 24 h) and 6 (K₂S₂O₈/ NaOH 65 °C, 24 h). All spectra were normed excepted for CA spectrum treated with protocol 5, for which a simple decrease in intensity was applied. A normed 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: poly(lauryl)lactam; PA-6: polycaprolactam; PC: polycarbonate; PET: polyethylene terephthalate; PMMA: poly(methyl-methacrylate); PP: polypropylene; PS: polystyrene; PTFE: polytetrafluoroethylene; PUR: polyurethane; PSXL: crosslinked polystyrene; uPVC: unplasticized polyvinyl chloride).

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 (K₂S₂O₈/ NaOH 65 °C, 24 h). (NA: not analysed).

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

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).

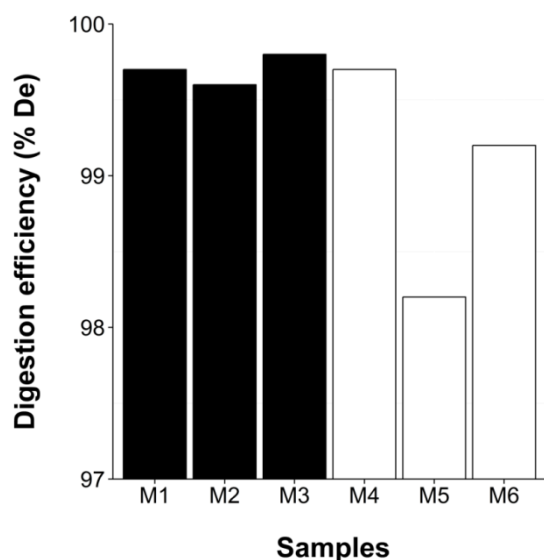


Fig 5. Bar chart representing individual digestion efficiencies (% De) (n=5) on three mussels, M1 to M3 for protocol 1b (KOH 10%, 24 h, 60 °C) in black and M4 to M6 for protocol 6 (K₂S₂O₈/ NaOH 65 °C, 24 h) in white. The very low standard deviations (< 0.01%) do not appear on bar diagrams as they could not be distinctively traced

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/cm³) was tested. This allows the recovery of all plastic particles, including the densest of the “big six”: PVC (1.38 g/cm³) or PET (1.37 g/cm³) (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.

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.

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 “Convention de Recherche et Développement” (2015-CRD-11). 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 files

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, Stamydan 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, Oroglass, Perspex, Plexiglas
Polypropylene	PP	Appryl, Hostalen PP, Lacqtene, Novolen, Propathene
Polystyrene	PS	-
Crosslinked polystyrene	PSXL	Q.200.5, Rexolite
Polytetrafluoroethylene	PTFE	Fluon, Hostafon 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
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
P1 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
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
P2 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
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 *
P3 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 *
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 *
P4 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 *
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
P5 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
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
P6 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

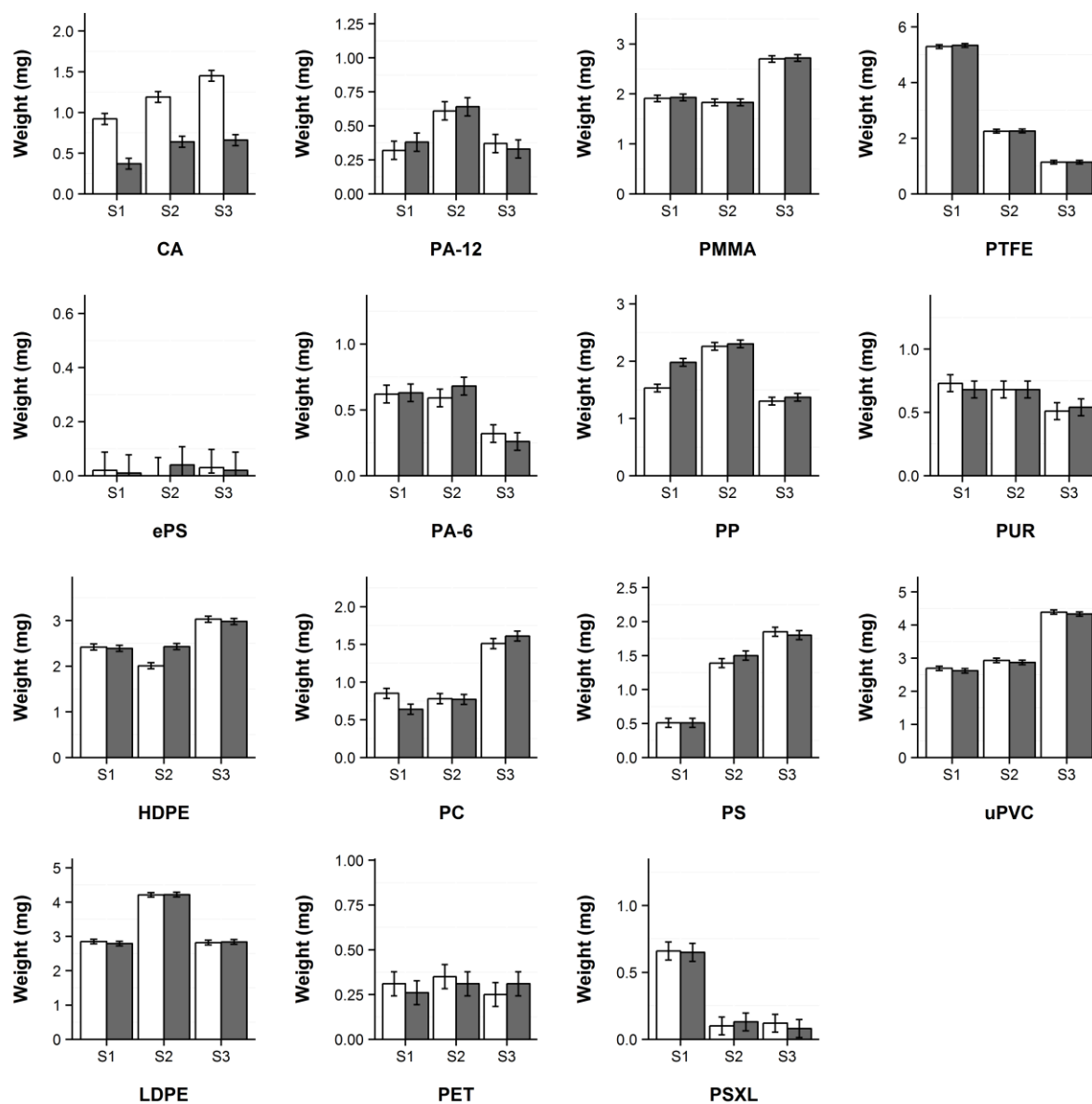
(HDPE: high density polyethylene; LDPE: low density polyethylene; PA-12: polylauryllactam ; PP: polypropylene; PS: polystyrene)
P1: Protocol 1 (10% KOH, 3 weeks, Room temperature); P2: Protocol 2 (0.5% Pepsin, 2 h, 37 °C); P3: Protocol 3 (65% HNO₃ at room temperature overnight, then 60 °C for 2 h); P4: Protocol 4 (4:1 (v/v) mix of 65% HNO₃ and 65% HClO₄ at room temperature overnight, then boiled for 10 min); P5: Protocol 5 (10M NaOH, 60°C, 24 h); P6: Protocol 6 (K₂S₂O₈/ NaOH, 65 °C, 24 h)

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

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

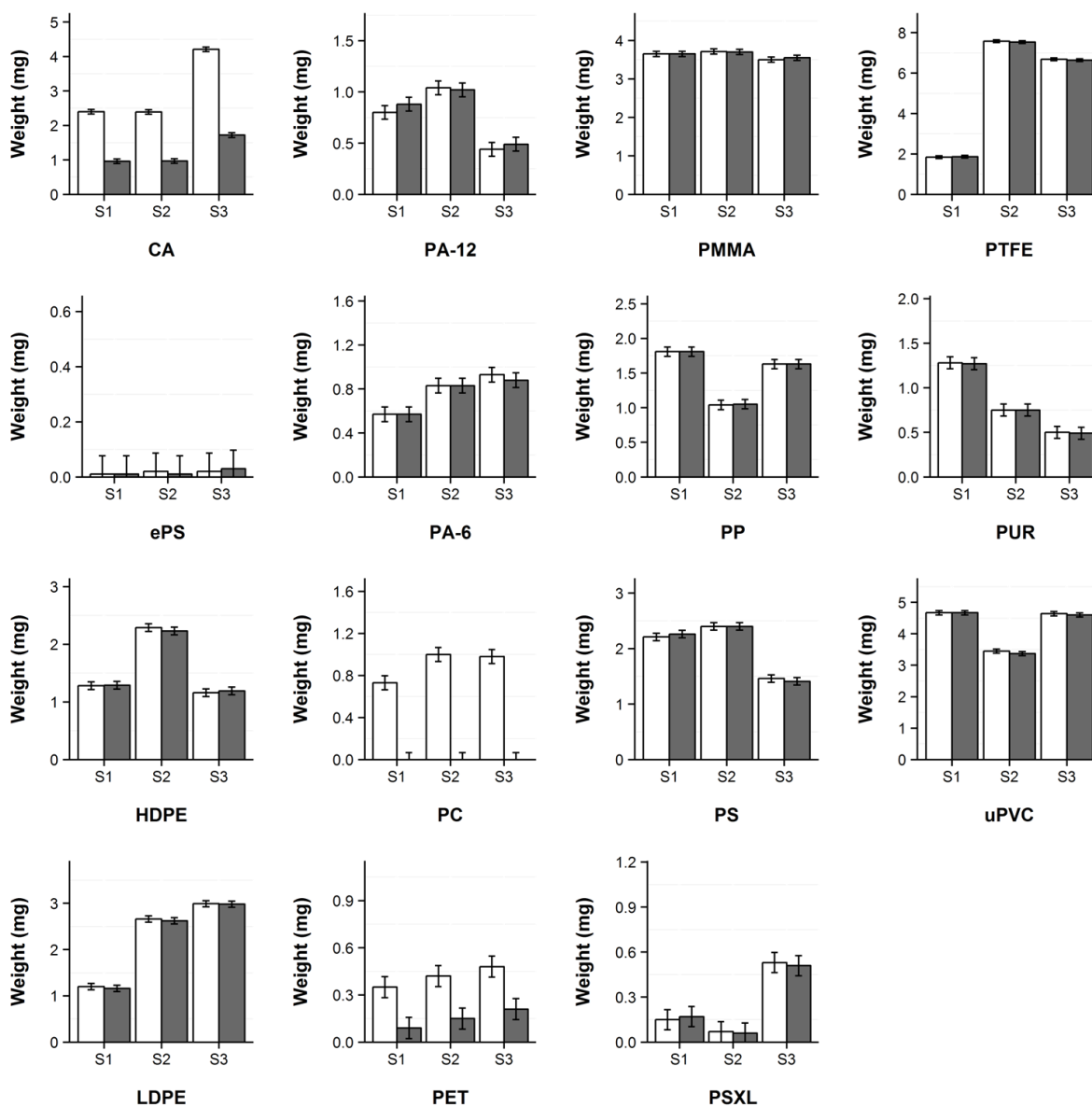
‘*’ Samples that melted during the application of digestion protocol

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



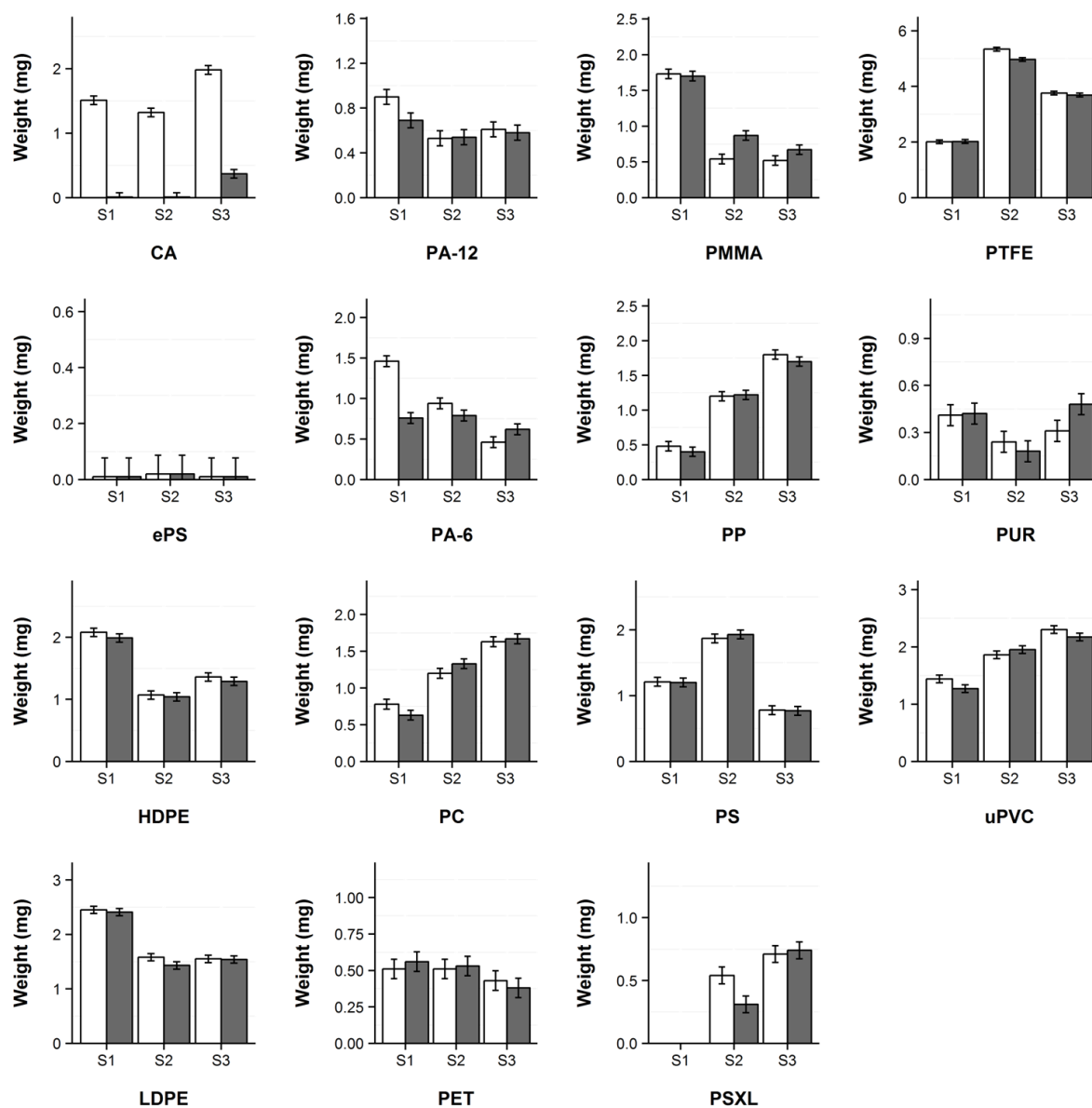
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); 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, 24 h, 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 *U_{eb}* (see 2.4).

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



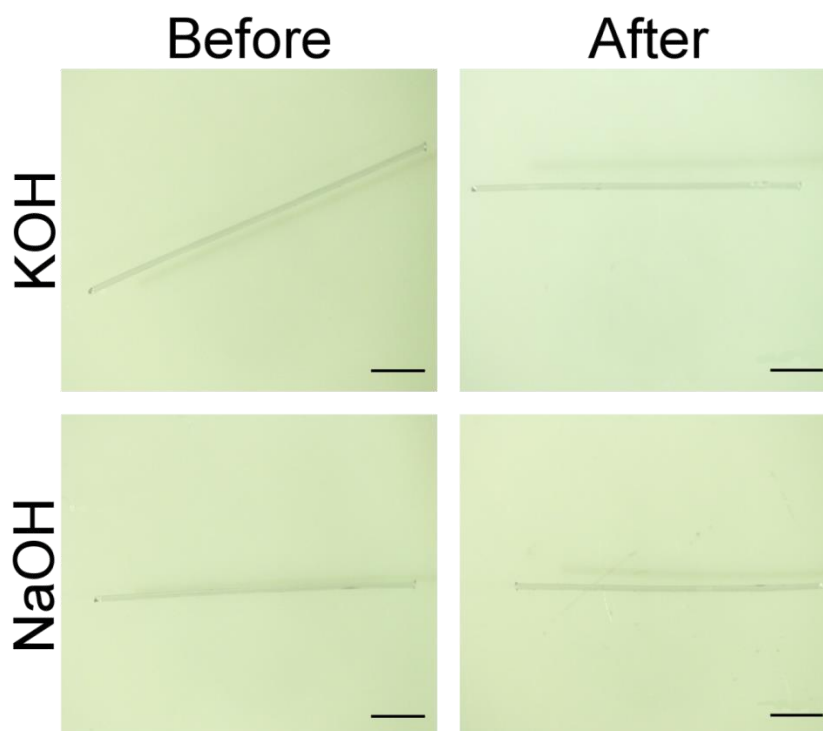
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); 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, 24 h. 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).

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



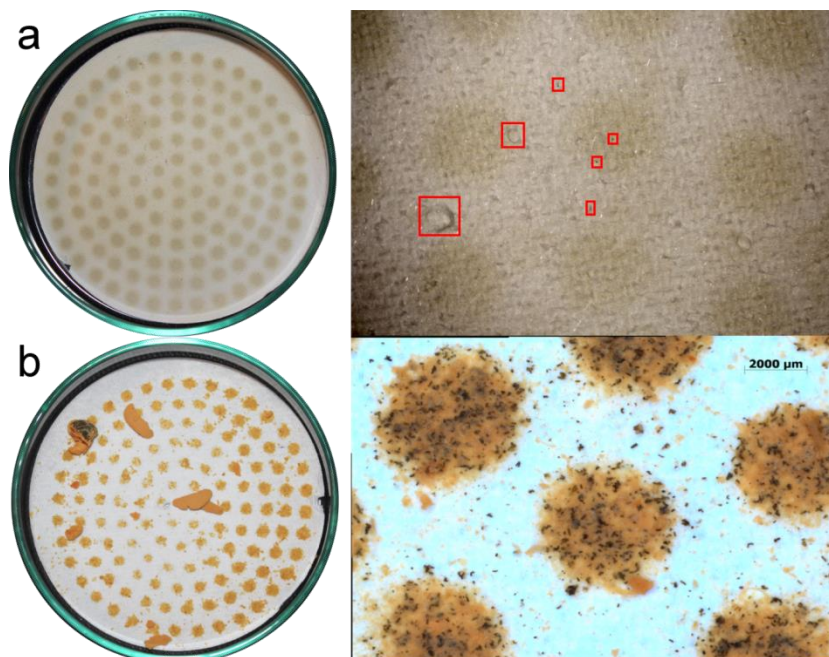
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); 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, 24 h. 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 *U_{eb}* (see 2.4).

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



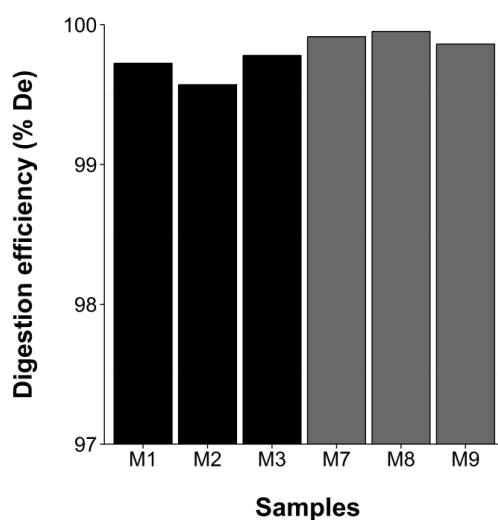
Visual inspection of nylon fibres (PA-6) before and after application of protocol 5 (10M NaOH 60 °C, 24 h) and 6 ($K_2S_2O_8$ / NaOH 65 °C, 24 h). No significant change was observed and identification by Pyr-GC/MS led to good identification with respective similarities of 96 and 99%.

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, 24 h, 60 °C) (a) and 6 ($K_2S_2O_8$ / NaOH 65 °C, 24 h) (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).



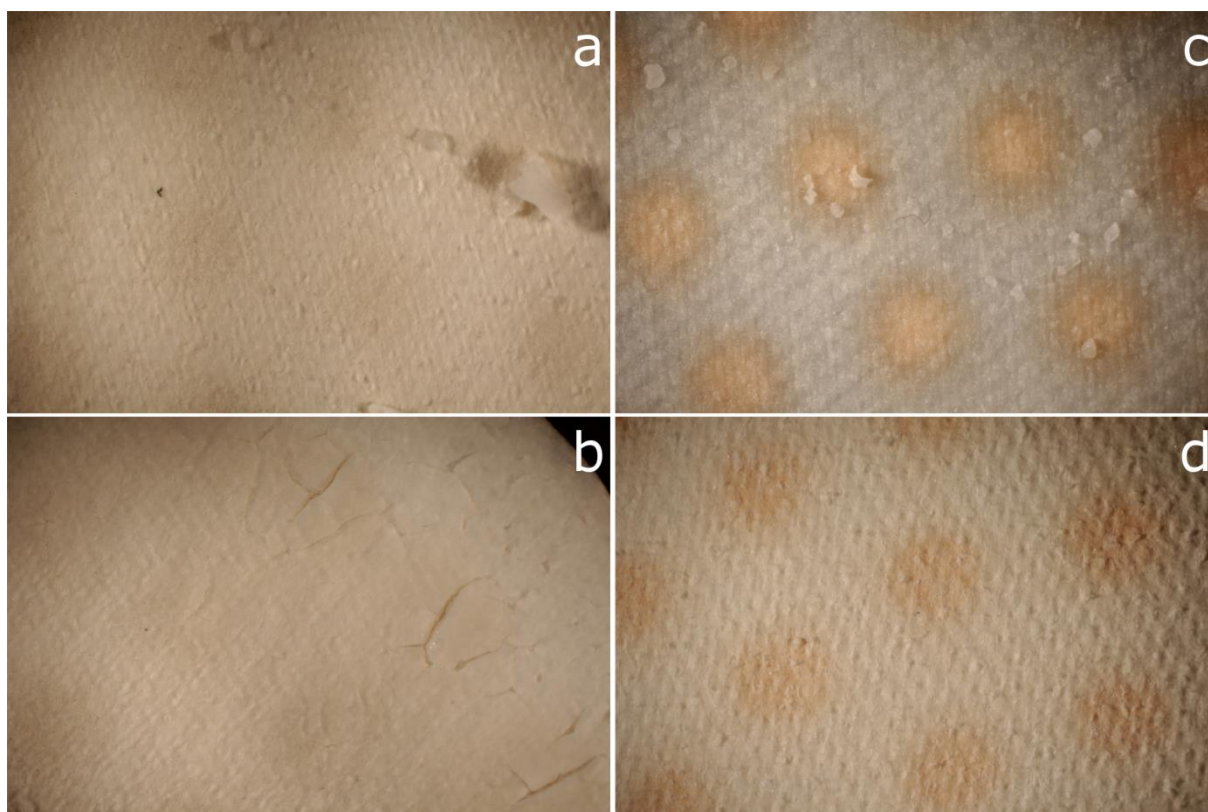
Bar chart representing individual digestion efficiencies (% De) on three mussels, M1 to M3 for protocol 1b (200 mL of 10% KOH, 300 rpm, 24 h, 60 °C) in black, and M7 to M9 for protocol 1b (100 mL of 10% KOH, 200 rpm, 24 h, 60 °C) in grey. The very low standard deviations (< 0.01%) do not appear on bar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

I.2 Optimisation des conditions de digestion des tubes digestifs de poissons

I.2.1 Introduction

Suite au développement de la méthode de digestion des tissus des produits de la pêche au KOH 10% (Section I.1), des difficultés ont été rencontrées pour la digestion des tractus gastro-intestinaux (TGI) d'une espèce de poisson : le merlan (*Merlangius merlangus*). Cette espèce faisant partie intégrante de l'échantillonnage des produits de la pêche réalisé pour évaluer la contamination aux MP de ces produits (Chapitre 3), il a été nécessaire de résoudre le problème de digestion des TGI. L'objectif des manipulations était d'améliorer la digestion des TGI des merlans de l'échantillonnage en (i) modifiant les paramètres de digestion (temps d'incubation, ratio de KOH/g de chair, vitesse d'agitation, concentration KOH), en (ii) modifiant la porosité des filtres utilisés ou en (iii) appliquant un prétraitement.

I.2.2 Matériel et méthodes

I.2.2.1 Echantillonnage

Les merlans ont été achetés localement chez les pêcheurs ou dans un supermarché. La masse de chaque TGI a été pesé (Sartorius CP3202S, Dourdan, France) permettant de les classer en trois catégories distinctes en fonction de leurs masses : <10 g, [10 – 20 g] et >20 g.

I.2.2.2 Paramètres de digestions initiaux

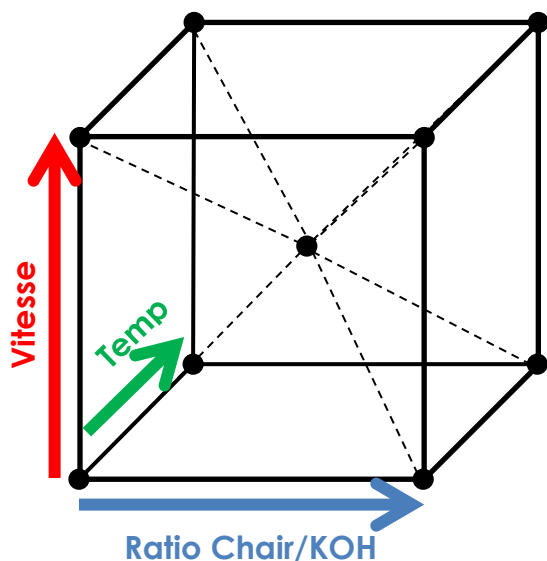
La digestion des TGI a été réalisée en utilisant un ratio initial de 7,5 mL de KOH/g de chair (KOH 10% (p/p) - ChimiePlus, Saint Paul de Varax, France) avec une agitation de 300 rpm (tour par minute) (2mag MIXDrive 6 HT, Munich, Allemagne) pendant 24h dans un incubateur (Binder BD 240, Tuttlingen, Allemagne) réglé à $60 \pm 1^\circ\text{C}$. La filtration a été réalisée avec des filtres en fibre de verre GF/A de porosité 1,6 μm (Whatman, Velizy-Villacoublay, France) à l'aide d'un système à vide Büchner. Pour toutes les approches, la filtration est relaisée de la manière décrite ci-dessus et seul les autres paramètres peuvent être modifiés.

I.2.2.3 Modifications des paramètres de digestion

I.2.2.3.1 Approche 1: Modification de la vitesse d'agitation, du ratio et du temps d'incubation

Une première approche a consisté à modifier les paramètres suivants : vitesse d'agitation, temps d'incubation et ratio de KOH/g de chair. Cette approche résulte en un total

de 9 expériences (Figure 16). Pour chaque expérience, 3 TGI de merlan des classes [10 – 20 g] ou > 20 g ont été utilisés.



Expériences	Vitesse	Ratio	Temps	Répétition
Exp 1.	300 rpm	7,15 mL / g	24 H	3
Exp 2.	300 rpm	11,15 mL / g	24 H	3
Exp 3.	900 rpm	7,15 mL / g	24 H	3
Exp 4.	900 rpm	11,15 mL / g	24 H	3
Exp 5.	600 rpm	9,15 mL / g	36 H	3
Exp 6.	300 rpm	7,15 mL / g	48 H	3
Exp 7.	300 rpm	11,15 mL / g	48 H	3
Exp 8.	900 rpm	7,15 mL / g	48 H	3
Exp 9.	900 rpm	11,15 mL / g	48 H	3

Figure 16 : Représentation des paramètres étudiés dans le plan d'expérience visant à évaluer les paramètres optimaux pour la digestion des tubes digestifs de poisson.

Pour chaque expérience, l'efficacité de digestion (%De) a été calculée selon la formule suivante où DW_{fad} correspond à la masse du filtre après filtration, DW_f correspond à la masse du filtre avant filtration et T_w correspond à la masse du TGI de l'individu.

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

Si la filtration n'est pas réalisée entièrement, un %De de zéro est alors appliqué. Les filtres ont été pesés sur une balance de précision 0,01 g (Sartorius CP3202S, Dourdan, France). De plus pour chaque expérience, le %De moyen est calculé.

1.2.2.3.2 Approche 2 : Application d'un prétraitement

Afin d'améliorer la digestion des TGI de merlans, des prétraitements ont été appliqués. Ces prétraitements incluaient la cuisson de l'échantillon à 150°C pendant 24h ou à 60°C pendant 72h (Firlabo, Emerainville, France), la lyophilisation de l'échantillon pendant 24h (CHRIST Alpha 2-4 LD, Osterode am Harz, Allemagne) et l'ajout de Tween 80® (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) à 0,005% (essai 1 à 4 – Tableau 7). Dans les cas de la cuisson à 60°C, la lyophilisation et de l'ajout de Tween, une décantation avant la filtration a été réalisée avec du Tungstate de sodium à 70% (p/p) (NaW – Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) en utilisant deux volumes de NaW pour un volume de KOH 10%. De plus, dans le cas de l'autolyse des TGI, un volume fixe de 500 mL pour trois TGI de la classe > 20

g a été utilisé menant à un ratio inférieur à 16 mL/g de chair. Pour déterminer la faisabilité des prétraitements de digestion dans le cadre de la recherche de MP, la filtration puis l'aspect des filtres obtenus ont été évalués. Si la filtration ne s'effectuait pas entièrement, le prétraitement n'était pas considéré comme correct. De plus, même si la filtration se faisait en une seule fois, le filtre était observé visuellement afin de savoir s'il pouvait être exploitable ou non dans le cas d'une recherche de MP.

1.2.2.3.3 Approche 3 : Modification de la concentration du KOH

En se basant sur le travail de [Kühn et al. \(2017\)](#), la concentration du KOH a été augmenté à 3,5 M (essai 5 – Tableau 7). Trois TGI des classes <10 g et [10 – 20 g] ont été utilisés pour ces essais. Pour déterminer la faisabilité de la modification de ce paramètre de digestion dans le cadre de la recherche de MP, la filtration puis l'aspect des filtres obtenus ont été évalués. Si la filtration ne s'effectuait pas entièrement, elle n'était pas considérée correcte. De plus, même si la filtration se faisait en une seule fois, le filtre était observé afin de savoir si il pouvait être exploitable ou non dans le cas d'une recherche de MP.

1.2.2.3.4 Approche 4 : Modification par combinaison des paramètres de digestion

D'autres essais ont été conduits afin d'améliorer la digestion des TGI de merlan. Pour ces différents essais (Essai 6 à 14 – Tableau 7), plusieurs paramètres de digestion incluant le ratio de KOH/g de chair, la concentration de KOH utilisée et la porosité des filtres ont été modifiées. Pour déterminer la faisabilité de la modification de ces différents paramètres de digestion dans le cadre de la recherche de MP, la filtration puis l'aspect des filtres obtenus ont été évalués.

Tableau 7 : Récapitulatif des différents paramètres de digestion des TGI de merlans. La vitesse d'agitation (300 rpm), le temps (24h) et la température d'incubation (60°C) étaient fixes pour tous ces essais.

Essai	Gamme de masse			Traitement préalable	[KOH]	Ratio	NaW	Filtre
	0 - 10 g	10 - 20 g	> 20 g					
Approche 2								
1				24h à 150°C	10%	-	Non	GF/A 1,6 µm
2	1	1		72h à 60°C	10%	7,15	Oui	GF/A 1,6 µm
3		2		Lyophilisation 24h	10%	7,15	Oui	GF/A 1,6 µm
4		1		Ajout Tween 0,05%	10%	7,15	Non	GF/A 1,6 µm
Approche 3								
5	2	1		-	3,5 M	7,15	Non	GF/A 1,6 µm
Approche 4								
6		2		-	10%	14	Non	GF/A 1,6 µm
7	1	1		-	10%	7,15	Non	GF/A 1,6 µm
8	2			-	10%	14	Non	GF/A 1,6 µm
9	1	2		-	10%	14	Non	GF/A 1,6 µm
10	1	1	1	-	10%	14	Non	What - 4
11			2	-	10%	14	Non	What - 4
12			3	-	5 M	7,15	Non	Tous
13			3	-	5 M	28	Non	GF/A 1,6 µm et Grade 4
14		1	2	-	5 M	28	Non	GF/A 1,6 µm

1.2.3 Résultats et discussion

1.2.3.1 Approche 1 : Modification de la vitesse d'agitation, du ratio et du temps d'incubation

Pour les expériences 3, 4, 6, 7, 8 et 9 de la première approche (Figure 16), aucun digestat n'a pu être filtré entièrement sur les filtres GF/A de porosité 1,6 µm menant à des %De égales à zéro. De plus, pour l'expérience 5, un échantillon sur trois n'a pas pu être filtré entièrement (%De = 65,78%). Les expériences 5 à 9 sont celles où le temps d'incubation a été augmenté de 24 à 36 ou 48h démontrant que l'augmentation du temps d'incubation n'a pas d'impact pour l'amélioration de la filtration des TGI de merlans. De plus, l'expérience 9 qui correspond à une augmentation de tous les paramètres de digestion ne s'est pas révélée être concluante. Il est important de noter que les seules expériences présentant des filtrations complètes sont celles de l'expérience 1 et 2 (%De = 97,91 et 96,17 respectivement). L'expérience 1 est celle de référence où aucun paramètre n'a été modifié et pour l'expérience

2 seul le ratio de KOH a été augmenté. Néanmoins, même si les filtrations des expériences 1 et 2 ont été réalisées entièrement, les filtres n'étaient pas exploitables pour la recherche de MP.

Pour conclure, la présente approche par modifications de trois paramètres (vitesse d'agitation, ratio de KOH et temps d'incubations) n'a pas permis d'améliorer la digestion puis la filtration des TGI de merlans dans le but de pouvoir rechercher les MP dans ces tissus. Il a donc été décidé de continuer l'optimisation de la digestion des TGI de merlans en faisant varier d'autres paramètres et en essayant de rajouter des étapes avant le processus de digestion au KOH 10%.

I.2.3.2 Approche 2 : Application d'un pré-traitement

Dans le cas de l'utilisation d'un prétraitement, seul l'essai 2 présente un taux de filtre exploitable supérieur à zéro (Tableau 8). L'utilisation de prétraitement avant la digestion n'a pas montré des résultats probants (Essai 1 à 4 - Tableau 8).

I.2.3.3 Approche 3 : Modification de la concentration du KOH

L'augmentation de la concentration du KOH de 10% à 3,5 M sans augmenter le ratio de KOH/g de chair (Essai 5) a démontré une bonne digestion puis filtration des échantillons (Tableau 8).

I.2.3.4 Approche 4 : Modification par combinaison des paramètres de digestion

Lorsque les modifications sont réalisées en combinaisons (Essai 6 à 14 - Tableau 7), les résultats sont beaucoup plus variables et sont dans l'ensemble plus satisfaisants (Tableau 8). Néanmoins, même en augmentant la molarité du KOH, son ratio et en filtrant sur des filtres de porosité 20 μm (Essai 13), la digestion et la filtration de TGI de la classe > 20 g ne sont pas exploitables pour la recherche des MP (Tableau 8) et la filtration n'est pas possible en utilisant des filtres de porosité 1,6 μm (Essai 14 - Tableau 8). Les essais 6, 8 et 9 ont été réalisés dans les mêmes conditions de digestions en utilisant des TD qui avaient des masses différentes mais toutes inférieures à 20 g (Tableau 7). Ces trois essais présentent des résultats différents : le pourcentage de filtre exploitable varie entre 50 et 100% mettant en évidence une forte variabilité individuelle.

Tableau 8 : Récapitulatif des pourcentages et nombre de filtres exploitables pour la recherche de MP suite à la digestion de TGI de merlans.

Essai	Nombre de filtre exploitable	
Approche 2		
1	0	0,0%
2	1	50,0%
3	0	0,0%
4	0	0,0%
Approche 3		
5	3	100,0%
Approche 4		
6	1	50,0%
7	1	50,0%
8	2	100,0%
9	2	66,7%
10	2	66,7%
11	2	100,0%
12	0	0,0%
13	1,5	50,0%
14	0	0,0%

I.2.4 Conclusion

Globalement, les changements de paramètres de digestion incluant la molarité du KOH, le ratio de KOH/g de chair, la vitesse et la durée d'agitation, l'augmentation de la porosité des filtres ou l'ajout d'étapes de prétraitement avant la digestion n'ont pas amélioré la digestion ni la filtration des TGI des merlans dans le but de rechercher les MP sur ces filtres. Les résultats sont très variables d'un échantillon à un autre même en considérant une même classe de masse de TGI. Afin de proposer un protocole de digestion standardisé des tissus des produits de la pêche, il semble plus réaliste de fixer des limites de poids de tissus permettant l'applicabilité de cette méthode.

I.3 Détermination des masses limites des tractus gastro-intestinaux de poisson pour l'analyse des microplastiques

I.3.1 Introduction

Ces travaux sur la recherche de masses limites permettant d'appliquer la méthode de digestion des TGI de poissons en utilisant la méthode préalablement sélectionnée a été réalisée en complément de l'article 2. Ce travail est en cours de préparation pour soumission au journal *Environmental Pollution* (**Article 3**) :

Dehaut A., Hermabessiere L., Himber C., Paul-Pont I., Soudant P., Duflos G., in prep. Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method. Environmental Pollution.

Ce travail a été réalisé, dans le cadre du CRD Microplastiques (2015-CRD-11), par l'équipe du département des produits de la pêche et d'aquaculture du laboratoire de sécurité des aliments (LSA) de l'Anses.

Les objectifs de ce travail étaient de déterminer les efficacités de digestion de 3 classes de masses (<7,5 g ; 7,5 – 15 g ; 15 – 22,5 g) de TGI de 5 espèces de poissons différents (Merlan, Maquereau, Sole, Bar et Daurade) afin de faire des recommandations concernant l'application de la méthode de digestion KOH 10%, notamment en fixant une masse de TGI limite d'utilisation pour ces 5 espèces.

Afin de répondre à ces objectifs, 10 individus par espèces de poisson et pour chaque classe de masses ont été achetés localement auprès de pêcheurs professionnel ou en supermarchés. Chaque TGI a été digéré en utilisant le protocole de digestion au KOH 10% (section I.1). Pour évaluer la bonne digestion des TGI, l'efficacité de digestion a été calculée et pour évaluer la filtration, chaque filtre a été photographié puis noté par un panel de 3 personnes familière avec la thématique des MP.

Dans ce travail collaboratif, je me suis particulièrement impliqué dans l'échantillonnage, les digestions, les différentes mesures permettant d'évaluer la bonne digestion/filtration des TGI de poissons.

1.3.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 3

La digestion des 5 espèces de poissons (Merlan, Maquereau, Sole, Bar et Daurade royale) en utilisant la méthode de digestion au KOH 10% a été effectuée afin de déterminer les efficacités de digestion du protocole sur 3 classes (<7,5 g ; 7,5 – 15 g ; 15 – 22,5 g) de TGI et de déterminer les masses limites permettant une bonne digestion/filtration des échantillons. L'évaluation de la digestion a été effectuée de deux manières : en calculant une efficacité de digestion (%De) et en évaluant la faisabilité de chercher des MP sur les filtres obtenus par notation.

L'efficacité de digestion (%De) ne s'est pas révélée très informative. En effet, pour certaines %De > 99%, les filtres présentaient une couche de graisse ne permettant pas l'observation de MP. La notation, par un groupe de manipulateurs (n=3) travaillant habituellement sur ce type de filtre, s'est avérée utile dans l'évaluation des poids limites de digestion pour les 5 espèces malgré le fait que cette notation soit plus subjective que la mesure de l'efficacité de digestion (Figure 17).

Il est toutefois important de noter que pour une même espèce et une même classe de masse de TGI, la digestion/filtration est très variable d'un individu à un autre. Néanmoins, il a été possible de déterminer les masses limites des TGI permettant une bonne digestion/filtration qui sont de 7,5 g pour la sole et le maquereau et de 15 g pour la daurade royale, le bar et le merlan (Figure 17).

Limites de poids d'application pour la digestion des TGI de poissons

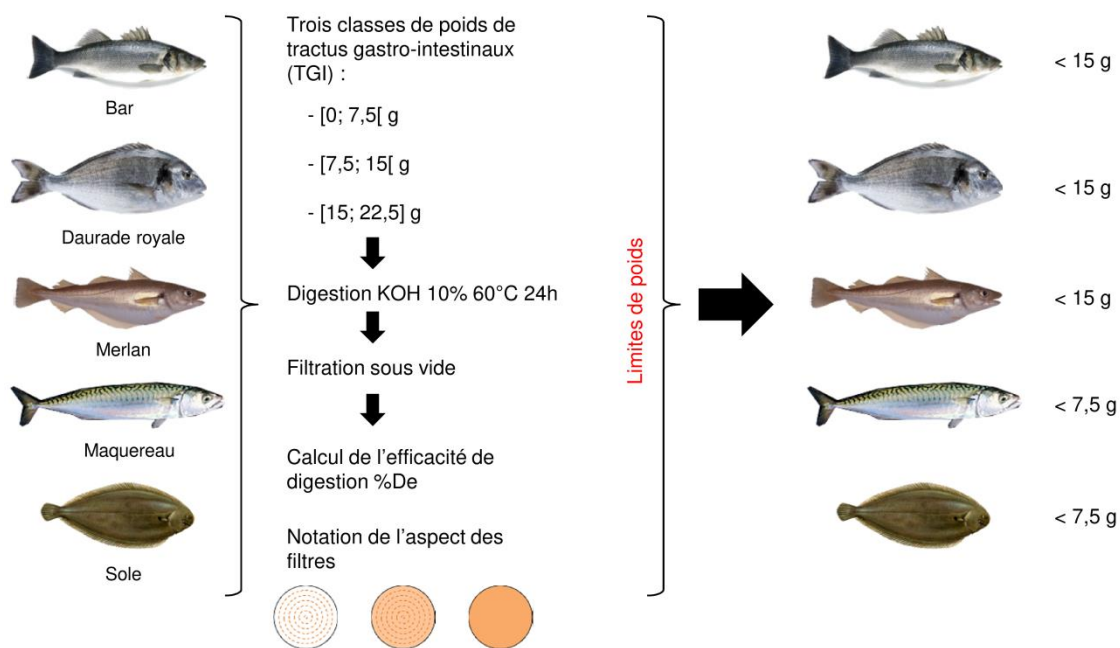


Figure 17 : Démarche expérimentale pour déterminer la masse limite des TGI pour la digestion au KOH 10% puis la filtration.

1.3.3 Article 3: Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method.

Study of microplastics in fish whole alimentary tract: Recommendations on the limits of applicability of the KOH digestion method.

Alexandre DEHAUT ^{a*}, Ludovic HERMABESSIERE ^a, Charlotte HIMBER ^a, Ika PAUL-PONT ^b, Philippe SOUDANT ^b & Guillaume DUFLOS ^a

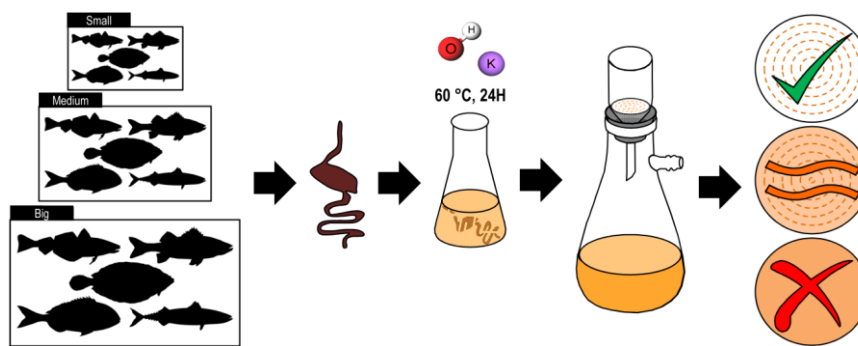
^a ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

^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

*Corresponding Author:

alexandre.dehaut@anses.fr

Graphical abstract



Abstract

A dissection and a digestion step are generally necessary to isolate microplastics (MP) from tissues, when studying their presence in aquatic organisms. The use of a 10% potassium hydroxide (KOH) solution to digest tissues and which has no impact on the integrity of plastics is now referred in several works on dozens of fish species. This study aims to evaluate the applicability of this method on the whole alimentary tract (WAT) of fish, considering the diversity of fish species and sizes. Five fish species with economic interest were selected: Mackerel (*Scomber scombrus*), Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Sea Bream (*Sparus aurata*), Sole (*Solea solea*) and Whiting (*Merlangus merlangius*). Three WAT weight classes were defined for each species: small [0.0 g; 7.5 g], medium [7.5 g; 15.0 g] & large [15.0 g; 22.5 g]. This corresponds to juveniles and adults fish that can be consumed by humans, which is important for risk assessment considering human health. After being digested, samples (n=10 per species and weight class) were filtered through glass fibre filters and digestion efficiency (%De) was calculated. Simultaneously, a filter notation was carried out by a panel of three operators to evaluate the exploitability of filters in the context of research on MP. The use of %De was not a good indicator on the ability to process a filter, contrary to filter notation. Heterogeneity in the overall filter exploitability was observed between the species and within weight classes suggesting important inter-species and inter-individual variations that may prevent efficient MP extraction. Using a single filter, 60% to 80% of the tested Whiting, Sea Bass and Sea Bream WAT were digested up to 15.0 g, huge debris being observed beyond. These percentages should thus be improved using more than a single filter. This limit is lowered to 7.5 g for Sole and Mackerel, for which the success rate is only 50%.

Keywords

microplastics, digestion, method, fish, application limit

1. Introduction

The study of the contamination of aquatic organisms by plastic microparticles with a size < 5 mm, also called microplastics (MP) (Arthur *et al.*, 2009), necessitates an isolation step for organisms tissues. Among the estuarine or marine species, fish were the subject of more than forty studies between 1976 and today. Most of these studies based their approaches on tissue dissection, directly taking MP-like particles off. Nonetheless this method could miss out on particles, embedded in tissues, particularly those with the smallest sizes (Miller *et al.*, 2017). To circumvent this risk, another strategy consists in hydrolysing tissues with chemicals such as acids (Claessens *et al.*, 2013; De Witte *et al.*, 2014), bases (Cole *et al.*, 2014; Foekema *et al.*, 2013), oxidizing solution (Claessens *et al.*, 2013; Collard *et al.*, 2015) or enzymatic solutions (Cole *et al.*, 2014). Among these approaches, some techniques cause problem due to the deterioration of polymers (Budimir *et al.*, 2018; Claessens *et al.*, 2013; Dehaut *et al.*, 2016; Karami *et al.*, 2017c).

The use of 10% potassium hydroxide (KOH) solution is the most employed methodology for chemical digestion, seven studies out of 28 using this approach for fish studies being recorded since its first description by Foekema *et al.* (2013). To date, tissues of 32 fish species were digested by 10% KOH (w/w) (Dehaut *et al.*, 2016; Hermsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2015b; Rochman *et al.*, 2015b; Tanaka et Takada, 2016). Except the works of Foekema *et al.* (2013) and to a lesser extent of Lusher *et al.* (2015b), studies are usually carried out on small fish or juveniles (Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Tanaka et Takada, 2016), while other studies did not report complete biometric data (Hermsen *et al.*, 2017; Kühn *et al.*, 2017). However the study of commercial sized animals is faintly performed which is problematic knowing the important expectations in terms of food safety and risk assessment dealing with microplastics and their

associate dangers: additives, microorganisms and chemical contaminants (Barboza *et al.*, 2018).

The need of method standardisation was requested by OSPAR (2015) with a specific part on the microplastic examination based on the digestion of tissue. This call has to be pursued on the KOH digestion method which proved to have no destructive action on the main polymers (Dehaut *et al.*, 2016; Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017). The current need with this method is the estimation of a ratio to know the volume of KOH necessary to carry out an optimal digestion. Unfortunately, to date except the work performed by Karami *et al.* (2017c), an unprecise parameter referred as “three times the volume of the biological material” is given in most of the studies (Hermsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017c; Rochman *et al.*, 2015b; Tanaka et Takada, 2016). Finally, during exploratory manipulations performed in our lab, it was noticed that depending on fish species and sizes, the available ratios did not lead to efficient and reproducible results.

The aim of this work was (i) to assess digestion efficiencies on three weight class of whole alimentary tract (WAT) from five fish species, and thus (ii) outline recommendations concerning the use of 10% KOH for these species and WAT classes.

2. Materials and Methods

All temperatures were recorded using the Labguard® 3D real-time monitoring system (Biomérieux, Craponne, France). A mapping of the incubator temperature was carried out in the analytical conditions to ensure the accuracy of the temperature. The analytical balances were daily controlled to guarantee measures accuracy.

2.1. Sampling

Five fish species were studied in this work. Withing (*Merlangius merlangus*), Mackerel (*Scomber scombrus*) and Soles (*Solea solea*) were bought in a local hypermarket of Boulogne-sur-Mer (France) directly purchased from local fishermen. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and

Sea bream (*Sparus aurata*) were purchased from an aquaculture farm (Aquanord Ichtuys, Gravelines, France). These fish species were selected based on their local availability, economic interest and consumption data for France (FranceAgriMer, 2017). These species represent more than 13% in metric tons and 25% in euros of the main fishery sold at auction. Finally, Sea bream, Mackerel, Whiting and Sea bass account from the fifteen main seafood species consumed in 2017. Fish provisions were performed from October 2017 to January 2018. After being sized using an ichthyometer for the recording of the total and standard lengths, fish were weighted using a 0.01 g sensitivity analytical balance (Sartorius CP3202S, Dourdan, France). Fish were then gutted to extract the whole alimentary tract (WAT) including oesophagus, stomach, pyloric caecum, and intestine. Concerning aquaculture produced fish, i.e. Sea bream and Sea Bass, fatty tissues around WAT were removed as much as possible before weighing. The WAT was then weighted using the 0.01 g sensitivity analytical balance. Three different weight classes were defined: small [0.0 g; 7.5 g], medium [7.5 g; 15.0 g], and large [15.0 g; 22.5 g]. Except for the large class of Sole WAT, where only five samples were collected, ten individuals were sampled for each weight class of each species; a total of 145 WAT were therefore collected. After sampling, WAT were stored, wrapped in a piece of paper surrounded by aluminium foil, at $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ until subsequent analysis.

2.2. Digestion and Filtration methodology

Digestion was performed as described by Dehaut *et al.* (2016). After being thawed for 2 h, at room temperature, WAT were placed into Erlenmeyer flasks and different volumes of 10% (w/w) KOH solution (ChimiePlus, Saint Paul de Varax, France) were subsequently added. A volume of 225 mL was poured for the small weight class, which correspond to a KOH/WAT ratio of 30 mL/g for the upper limit of this weight class. This constant 10% (w/w) KOH volume was selected to avoid too low volumes, limiting the performance of the digestion method. For the

medium and large classes, 10% (w/w) KOH volumes were poured respecting the ratio of 30 mL/g. The ten samples of the same weight class for a given species were digested in a single batch. Digestion consisted in an incubation of Erlenmeyers at $60 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h in incubator (Binder BD 240, Tuttlingen, Germany). Erlenmeyer flasks contents were agitated at 300 rpm using triangular magnetic stirrers on two 6 stirring positions devices (2mag MIXDrive 6 HT, Munich, Germany).

After digestion, flasks were placed in a water-bath (Julabo TW12, Colmar, France), to be conserved at $60 \pm 1^\circ\text{C}$ environment until being filtered. Filtration was performed using a glass Büchner hermetically placed on a flask, vacuum being insured with a pump (KNF N8KN18, Village-Neuf, France). Digestates were filtered through 90 mm GF/A 1.6 μm glass fibre filters (Whatman, Velizy-Villacoublay, France).

2.3. Digestion efficiency assessment

In order to evaluate digestion efficiency, two methods were selected: calculation of a digestion efficiency percentage (%De) and filter aspect notation by a panel of three operators familiar with digestive tract digestion and MP analysis. Concerning %De calculation, clean filters were placed for 24 h at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ for drying before being weighted five times (DW_f) on a 1mg sensitivity analytical balance (Sartorius CP224S, Dourdan, France). This operation was repeated after individual filtration of the digestate (DW_{fad}). %De were calculated following the formula of Dehaut *et al.* (2016) described below, where DW_f and DW_{fad} are above described and T_w corresponds to the weight of digested tissues. For a few samples the whole digestate could not be filtered due to clogging, %De was thus set to 0%.

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

Concerning filter notation, after the last weighing each filter was pictured using a Canon EOS 1000D camera equipped with a standard EF-S 18-55 mm objective. A unique compilation of slides has been generated with a random distribution of anonymized filter pictures. This procedure was carried out using a personal script

(Supplemental Script 1) launch on R software (3.4.2) (R Core Team, 2015). Three types of mark were assigned by judges: “Yes”, “No”, “No but” respectively corresponding to an analysable filter, a non- analysable filter and filter that would have been analysable under reserve that the filtration was carried out on more than a single filter (Supplemental Figure 1). Whenever the operators did not share the same opinion, the majority opinion was retained.

2.4. Statistics

All results were expressed as mean \pm standard deviations (S.D). Boxplot were drawn using package ‘ggplot2’ version 2.2.1 (Wickham, 2016) in R software (3.4.2).

3. Results and Discussion

3.1. Sampling

Regarding Mackerel, weight of samples were well distributed across the three size classes (Figure 1). Concerning Sea bass, Sole and Whiting, the medium class is usually asymmetric with respectively 60%, 70% and 70% of samples below 10.0 g (Supplemental Table 1). Similarly, an asymmetry was noticed for the small class of Sea Bream and the large class of Sole, with

respectively 60% of samples above 6.2 g and three out of five samples below 16.0 g (Supplemental Table 1).

Concerning the small class samples, as three species consisted in wild fish, there was less control on the individuals sizes, first subjected to the vagaries of catches and then in terms of minimal catching size provided in the Annex XII of the European Council Regulation No 850/98 (Council Regulation, 1998). Thus, except for Soles, WAT weights were greater than 5.0 g. The exception of Sole is explained by the low weight of WAT, between 2.5 and 3.5 g, for the individuals close to the minimal catching size of 24 cm. Concerning aquaculture produced fish, it was easier to get smaller fish, even under commercial size for some individuals. Nonetheless, the major issue with these fish was the presence of a huge quantity of fatty tissues around WAT as described in the review of (Grigorakis, 2007) on farmed and wild Sea bream and Sea bass. Small pieces of fat tissues could not be removed without affecting WAT integrity and thus led to filtration concerns (see 3.2). Finally it should be noted that, for all fish and species, WAT content may have differed, influencing WAT composition and weights.

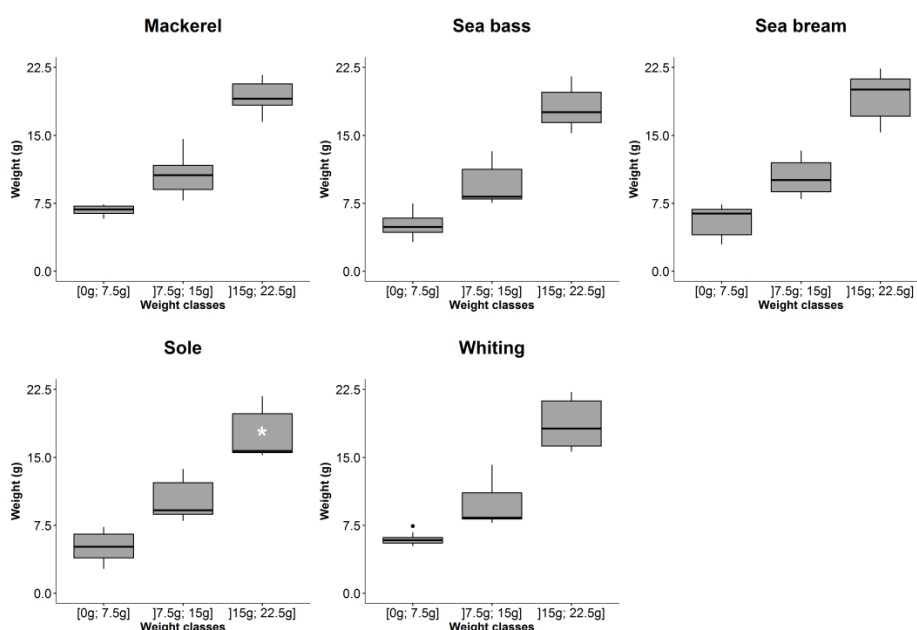


Figure 1: Boxplot illustrating the weight distribution for each weight classes [0 g; 7.5 g], [7.5 g; 15 g] and [15 g; 22.5 g], for the five studied species, respectively Mackerel (*Scomber scombrus*), Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Sea Bream (*Sparus aurata*), Sole (*Solea solea*) and Whiting (*Merlangius merlangus*). White asterisk recalls that only 5 samples were collected for the [15 g; 22.5 g] weight class of Sole. The black dot marks an outlier for the [0 g; 7.5 g] weight class of Whiting.

Nonetheless, these conditions reproduce as closely as possible what can be encountered by scientists leading research on MP in fish WAT.

Among biometric characteristics, the weights of analysed samples, whole fish and WAT as well as the volume of digesting solutions should be mandatory for any methodological development. Whereas these are essential pieces of information for decision support concerning tissue digestion, the description of whole fish characteristics is generally uniquely provided in scientific articles (Budimir *et al.*, 2018; Lusher *et al.*, 2015b). Nonetheless when the biometric data of all individuals, such as WAT weights, cannot be communicated, especially due to the importance of sampling, a ratio should be indicated as a minimum (Karami *et al.*, 2017c). Fixed volumes of digesting solutions not taking into account the mass of tissue to be digested must be avoided as much as possible to guarantee reproducibility of methods. However, as observed in this study for small WAT, a tolerance could be accepted for small samples which would require, when respecting the ratio, the addition of a too small volume of solution, blocking the stirring system as observed in preparative experiments.

Another important aspect is that the present work was performed on commercial species of sizes greater than minimal catch sizes, i.e. relatively big fish compared to other studies that mostly focused on juveniles or small fish (Budimir *et al.*, 2018; Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Naidoo *et al.*, 2017). These types of samples also have to be included and considered in future studies, as they are of interest in terms of risk characterization for human being in the context of the direct or indirect impact of MP on human health.

3.2. Digestion efficiency assessment

Digestion efficiencies are figured in Table 1. For all species, the large weight class always displayed low %De. Based on %De, Whiting was

the easiest digested species with percentages higher than 98.9% for both small and medium samples. On the contrary, Soles and Mackerel only displays acceptable %De for the small class of WAT, higher class being marked by a high dispersion of percentages. Aquaculture produced species are also characterized by highly dispersed results even for small class. Average %De are very close for all WAT classes for Sea bass whereas mean %De of large Sea bream is far lower than the ones of small and medium class. For Mackerel (one medium and one large WAT), Sea Bream (five large WAT), Sole (five medium and two large WAT) and Whiting (four large WAT), %De equal to 0% were recorded, corresponding to digestates that could not be entirely filtered due to clogging issues. This led to huge standard deviations (Table 1).

Table 1: Average digestion efficiencies (%) based on species and TD weight classes

Species	WAT weight class	
	WAT weight class	Average %De*
Mackerel	[0 g ; 7.5 g]	98,7 ± 1,7 %
]7.5 g ; 15 g]	85,8 ± 30,2 %
]15 g ; 22.5 g]	88,8 ± 31,2 %
Sea bass	[0 g ; 7.5 g]	88,2 ± 3,3 %
]7.5 g ; 15 g]	92,7 ± 3,7 %
]15 g ; 22.5 g]	92,4 ± 3,6 %
Sea bream	[0 g ; 7.5 g]	92,2 ± 2,5 %
]7.5 g ; 15 g]	94,8 ± 2,4 %
]15 g ; 22.5 g]	47,8 ± 50,4 %
Sole	[0 g ; 7.5 g]	98,8 ± 1,4 %
]7.5 g ; 15 g]	49,2 ± 51,9 %
]15 g ; 22.5 g]	59,2 ± 54,1 %
Whiting	[0 g ; 7.5 g]	98,9 ± 1,1 %
]7.5 g ; 15 g]	99,4 ± 0,4 %
]15 g ; 22.5 g]	59,4 ± 51,1 %

* Value given at the right of the ± symbol corresponds to the standard deviation (n=10, except for Sole]15 g ; 22.5 g] where n=5)

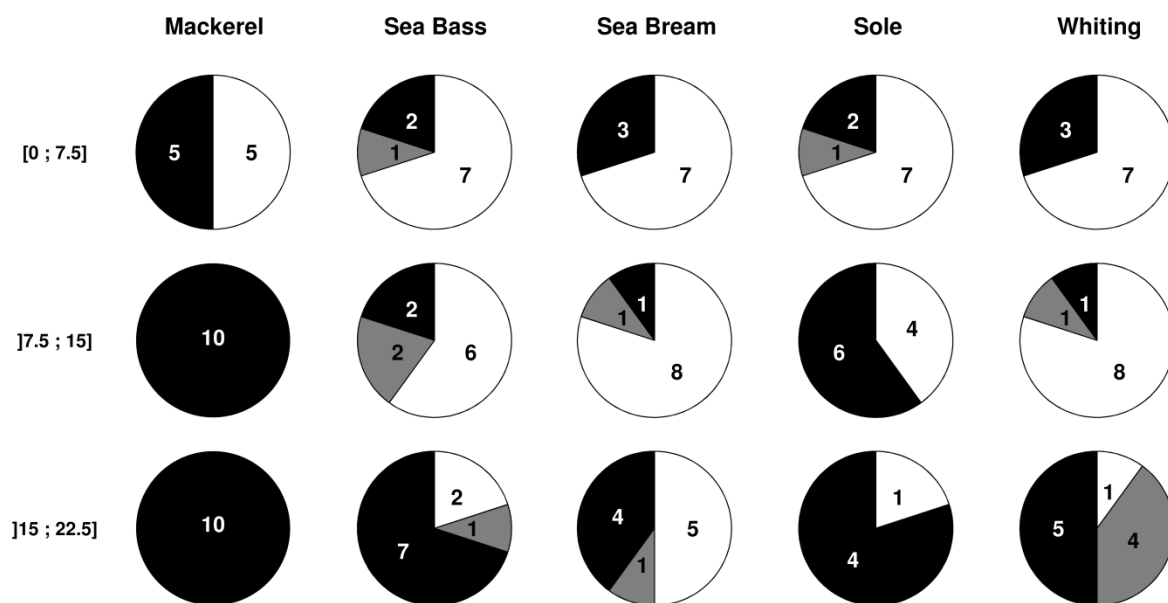


Figure 2: Circular diagrams representing the number of notes “Yes”, “No but” and “No” collected for the filters (n=10) obtained after digestion of WAT for each fish species and weight class (except for Sole [15 g; 22.5 g], where n=5). Notes “Yes”, “No but” and “No” are respectively represented by white, grey and black colours. Figures present in each sections of diagrams represent the number of filter classed in the related category.

Based on filter observation (Figure 2), Mackerel was the most problematic species with a highly tedious filtration for all WAT weight classes. Observation of filters for medium and large weight class was highly difficult or impossible due to the presence of non-digested materials. Within the small class of WAT half of the samples were not analysable; no relationship being however established between the ability to observe filter and individual size, total weight, or weight of WAT. Sole was the second problematic species, but mostly for large and medium WAT. Loaded filters were due to the presence of sediment into some WAT content. Considering aquaculture produced fish, there was more filtration difficulties recorded for Sea Bream compared to Sea Bass. Dissimilarities of filter aspects were observed for medium and large WAT. A substance supposed to be a “greasy” liquid, diffused into the thickness of some filters leading to their yellowing as well as a semblance of transparency (Supplemental Figure 2); nonetheless, observations were not that much impacted by this greasy matter for both aquaculture produced fish species. The less problematic species were Sea Bass and Whiting, where similar results were recorded, i.e. filtration can be performed for small and medium WAT.

Regarding these two species, filtration of large WAT is more problematic for Whiting compared to Sea Bass.

A brief comparison of filters and %De led to the conclusion that a %De close to 99% could represent the limit between acceptable and non-acceptable filters. Wild fish species concerned with this parameter were: Mackerel (small WAT), Sole (small WAT) and Whiting (small and medium WAT) (Table 1). Unfortunately, this limit could only be applied to wild fish, indeed despite %De well below 99%, filter from aquaculture produced fish were mostly acceptable for the small WAT. As mentioned in 2.1, fatty tissues covering WAT were as much as possible discarded, nonetheless some pieces have remained. On the corresponding filter, this “greasy” layer contained in the thickness of the filter had an impact on the calculation of %De, increasing the filter weight after digestion, but without consequence on the filter examination. Thus solely based on the %De result, it was difficult to estimate whether a filter is analysable or not. A complementary parameter, i.e. observation of filters, had to be taken in consideration to distinguish analysable and a non-analysable filters (Figure 2).

Giving the upper limit of used method is another important aspect, as emphasized by Budimir *et al.* (2018). Regarding this section, a majority of samples can be filtered until a WAT weight of 15.0 g samples of Sea bass (70 & 80%), Sea Bream (60 & 70%) and Whiting (70 & 80%) and Sole until a WAT weight of 7.5 g (70%). The filtration of digested Mackerel WAT is problematic because of non-digested materials from the small WAT. The proposed percentages should be improved under reserve of using more than a single filter to insure filtration, cf. “No but” on Figure 2, slicing of samples being not considered as a good solution in case of MP studies due to the risk of contamination. The counterpart of this solution is the increase in analysis processing time, whether during a manual or automatic search of MP. To authors knowledge, the latter approach has only been performed on mussel and oyster digestats for seafood (Phuong *et al.*, 2018a; Phuong *et al.*, 2018b), but it do not seem to be easily transferable with filters of fish digestate.

The main information emerging from this part is that there is huge variability of the results, even for a given species and for a specific WAT weight class. This variability could be explained by the use of wild fish, and it has been demonstrated for other species that tissue composition may vary among fish from a single catch (Karl *et al.*, 2018). Moreover, fish were caught on different days, increasing the risk to get individuals with different physiological state and WAT content. Additionally, it shall be recalled that the chemical composition of fish tissue and WAT content can tremendously vary across seasons (Huss, 1995), potentially impacting digestion efficiencies. These differences reflect nonetheless what scientists can face by studying fish caught in the wild. Besides, it should be noted that conclusions on aquaculture produced fish must be taken with care. Indeed in aquaculture there is a strict control of feed, which is different from the natural environment. As an example, Sea bream are known to consume hard-shelled prey in the environment (Andrew *et al.*, 2003), this fact

could have a direct consequence on filter clogging.

One of the tracks to improve digestion efficiencies could be to use more concentrate KOH as proposed by (Kühn *et al.*, 2017), but the use of 3.5 and 5M on a few samples during the preliminary work did not led to satisfactory results due to clogging issues. Another promising track would be to use filters with higher porosity such as 25 or 30 μm pore size glass fibre filters. Nonetheless these filters necessitate using particular filtration system, glass filter holder and assembly clamp instead of glass Büchner, additionally this raise a second concern on MP smaller than 25/30 μm that would not be analysable with this technique.

As previously mentioned this study focused on commercial-size fish, which is important in term of risk assessment for human being. Although not belonging to the commonly consumed parts of the fish in the Western countries; it should not be forgotten that in some regions of the world, like in South East Asia, WAT can be consumed as a food like in the Thai *Kaeng tai pla* (Tangkanakul *et al.*, 2005). These habits could also evolve in the upcoming years with the development of nose-to-tail cookery movement. Finally, to get a better idea of MP risk when eating fish, digestion of other tissues of fish such as fillet or small whole fish, have also to be studied and standardised.

4. Conclusion

A total of 145 WAT of five fish species with weights ranging from 2.7 g to 22.2 g were digested using the 10% KOH method and then filtrated on glass fibre filters. Two indicators of filtration performance were used to evaluate whether filters were analysable or not. Despite being more objective, %De calculations is tough to employ, particularly in the case of some samples where a “greasy” liquid infused into the filter, artificially increasing the filter weight after digestion. For other samples, i.e. wild samples in this work, a limit of 99% could be proposed. This information is confirmed by the operator notations. Next methodological approaches using a filtration step should employ such a global

strategy. Research papers should also be more informative on weights of analysed tissue particularly when a method development is presented.

Heterogeneous results were obtained even into a weight class for a given species. Whiting was the less problematic species followed by Sea Bass and Sea Bream even if dissimilar results were obtained for the medium and large class. The unique benthic studied species, Sole, poses problem from the medium class due to the presence of sediments in WAT content. Mackerel was the most problematic species, difficulties filtering being encountered from the small class. An upper limit of applicability of the KOH digestion method was proposed for the five species, based on different KOH volumes considering WAT weight classes. Whiting, Sea

Bass and Sea Bream can be analysed for WAT up to 15.0 g (60 – 80% of samples). The upper limit for Sole and Mackerel is 7.5 g, but only half of Mackerel WAT (n=5) was exploitable.

Acknowledgments

Authors are grateful to Arnaud Huvet for his kind critical review of the manuscript. Authors warmly thank Mélanie Gay for her valued help with metrology issues and Marie-Ange Huchin for her kind technical assistance. This work was funded by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) through a «Convention de Recherche et Développement» (2015-CRD-11). Ludovic Hermabessiere is thankful to Région Hauts-de-France and ANSES for the financial support of his PhD.

Supplementary file

Supplemental Table 1: Biometric data on sampled fish

Species	Class	Individuals	Total length (cm)	Standard length (cm)	Weight (g)	WAT weight (g)
Whiting	[0 g; 7.5 g]	1	29.0	23.5	209.9	6.72
		2	29.0	23.5	196.2	5.84
		3	29.5	24.0	198.3	5.56
		4	29.0	23.5	196.1	5.18
		5	29.4	23.5	194.0	5.52
		6	29.0	24.0	203.0	6.00
		7	28.2	25.5	180.3	7.41
		8	27.0	22.0	167.8	5.83
		9	No tail	24.6	176.5	6.20
		10	43.7	27.0	150.6	5.32
]7.5 g; 15 g]	1	39.0	32.5	425.9	13.79
		2	41.5	34.5	562.4	14.17
		3	34.5	28.5	353.3	11.98
		4	31.0	25.0	200.3	7.94
		5	29.5	23.5	214.8	8.39
		6	30.5	25.0	253.7	8.24
		7	29.8	24.5	211.5	7.76
		8	31.5	25.0	243.3	8.42
		9	29.2	23.7	200.3	8.20
		10	33.5	26.5	292.1	8.19
]15 g; 22.5 g]	1	40.0	35.5	547.2	18.86
		2	38.5	31.5	424.2	16.07
		3	40.0	33.5	476.7	22.19
		4	39.0	32.0	496.2	20.41
		5	43.0	34.0	526.3	21.49
		6	42.5	35.0	534.5	22.22
		7	40.0	33.0	539.1	16.81
		8	41.5	34.0	510.5	15.60
		9	37.0	30.8	398.2	17.47
		10	40.0	33.5	513.9	15.91
Mackerel	[0 g; 7.5 g]	1	26.0	21.5	131.6	6.63
		2	26.0	22.0	127.5	5.94
		3	25.5	22.0	128.6	7.37
		4	26.0	21.8	135.4	7.22
		5	25.5	22.5	131.7	6.44
		6	25.0	21.5	129.9	5.78
		7	26.0	21.5	125.6	6.37
		8	26.5	23.0	153.7	7.11
		9	27.2	22.8	146.2	6.99
		10	27.5	23.0	157.3	7.29
]7.5 g; 15 g]	1	26.0	23.0	139.3	8.27
		2	32.0	27.0	314.3	14.55
		3	32.5	27.5	268.6	14.60
		4	30.5	26.0	211.8	10.91
		5	27.0	23.0	oubli	10.67
		6	27.0	23.0	153.3	8.92
		7	25.0	22.0	129.5	7.80
		8	31.5	26.0	271.7	10.50
		9	26.0	23.0	158.2	9.30
		10	31.5	26.0	242.5	11.93
]15 g; 22.5 g]	1	32.5	28.5	351.1	18.25	
	2	35.5	30.0	414.5	19.38	
	3	35.5	30.0	374.4	20.49	
	4	33.5	29.5	347.7	17.74	
	5	37.5	31.5	409.0	21.34	
	6	35.0	29.5	410.2	16.47	
	7	33.0	28.5	368.1	18.60	
	8	35.3	3.5	362.5	21.67	

Chapitre 2 Développements méthodologiques - Sélection, optimisation et limites d'un protocole pour extraire les microplastiques des tissus des produits de la pêche

Species	Class	Individuals	Total length (cm)	Standard length (cm)	Weight (g)	WAT weight (g)
Sea Bream		9	35.0	31.0	373.4	20.76
		10	37.0	31.0	410.5	18.71
	[0 g; 7.5 g]	1	21.0	17.9	179.8	7.34
		2	20.6	17.2	149.4	7.25
		3	15.8	13.0	67.7	2.94
		4	17.7	14.6	87.4	3.88
		5	21.5	18.0	183.0	6.91
		6	16.6	14.0	78.2	4.21
		7	20.6	17.1	150.4	6.19
		8	17.1	13.5	88.1	6.52
		9	22.0	16.5	185.7	6.63
		10	16.5	12.3	76.6	3.96
]7.5 g; 15 g]	1	21.6	16.0	195.7	11.04
		2	25.6	21.0	277.4	8.60
		3	27.1	22.5	299.3	8.65
		4	26.0	21.5	363.8	10.07
		5	26.6	22.0	264.1	9.18
		6	24.2	20.4	247.0	10.03
		7	26.0	21.5	257.5	7.97
		8	29.7	24.7	447.9	13.30
		9	29.0	24.0	399.8	13.13
		10	29.6	22.5	423.2	12.28
]15 g; 22.5 g]	1	34.5	26.7	736.2	15.33
		2	34.0	28.0	719.2	19.82
		3	35.5	22.5	674.2	21.32
		4	34.0	27.5	777.6	16.84
		5	37.7	28.0	657.4	20.96
		6	30.5	23.0	528.5	16.14
		7	29.9	24.5	505.0	21.70
		8	34.5	25.0	585.6	22.37
9		30.0	23.5	451.5	20.26	
10		29.7	24.5	465.2	17.97	
Sea Bass	[0 g; 7.5 g]	1	26.2	20.5	206.3	7.32
		2	18.0	15.5	61.4	4.32
		3	16.5	14.5	61.4	3.41
		4	17.8	14.0	67.0	5.53
		5	22.2	18.0	136.0	7.48
		6	17.5	14.0	60.3	5.41
		7	19.8	15.5	94.0	4.29
		8	17.5	14.6	62.9	5.96
		9	18.1	14.2	66.2	3.19
		10	20.7	16.3	95.8	4.35
]7.5 g; 15 g]	1	22.0	17.5	139.0	8.10
		2	23.6	19.2	158.2	7.96
		3	25.8	20.4	186.8	7.53
		4	23.9	19.6	171.3	7.77
		5	25.0	20.3	177.6	7.96
		6	23.7	19.4	156.8	10.25
		7	21.3	17.2	114.0	8.32
		8	33.2	29.4	406.5	11.58
		9	34.5	27.5	375.6	12.95
		10	33.7	29.5	448.4	13.23
]15 g; 22.5 g]	1	32.7	26.5	443.7	20.14
		2	33.0	26.5	423.3	16.45
		3	39.6	34.5	807.6	18.60
		4	38.8	35.2	809.8	21.49
		5	38.0	32.5	759.8	17.73
		6	35.0	28.7	683.4	15.47
		7	36.4	32.0	607.1	15.24
		8	38.0	30.0	612.7	21.11
		9	32.4	26.5	463.2	17.37
		10	34.5	31.0	510.5	16.40

Chapitre 2 Développements méthodologiques - Sélection, optimisation et limites d'un protocole pour extraire les microplastiques des tissus des produits de la pêche

Species	Class	Individuals	Total length (cm)	Standard length (cm)	Weight (g)	WAT weight (g)
Sole	[0 g; 7.5 g]	1	29.0	29.5	238.2	7.25
		2	28.0	25.0	217.1	5.06
		3	26.0	22.5	137.2	5.19
		4	25.0	22.5	130.9	2.69
		5	25.5	22.0	143.1	3.41
		6	28.0	24.0	186.0	3.69
		7	28.5	24.5	208.8	6.06
		8	27.7	24.9	220.6	4.56
		9	31.5	22.5	272.6	7.30
		10	No measure	26.0	265.8	6.67
]7.5 g; 15 g]	1	27.9	24.5	217.7	9.20
		2	30.2	25.6	236.2	8.84
		3	29.0	25.5	259.8	7.99
		4	31.2	27.4	249.9	13.06
		5	28.5	23.0	239.5	8.66
		6	31.8	27.5	377.7	9.11
		7	33.4	29.0	348.1	9.63
		8	33.9	30.0	357.0	8.30
		9	35.2	29.5	373.3	13.71
		10	33.3	29.5	419.0	13.57
]15 g; 22.5 g]	1	36.5	31.5	626.3	19.82	
	2	35.7	33.1	591.4	15.69	
	3	38.5	34.0	655.1	15.21	
	4	43.7	39.5	828.8	21.74	
	5	43.3	38.5	945.9	15.52	

Supplemental Script 1: Random distribution of anonymized filter pictures in scorecard

```
#Package used for scorecard generation in a word file.
library(ReporteRs)
#Definition of the working and "sub-working" directories. It has to be modified by user
depending on their PC environment.
work.dir <- c('X:/Folder/...')
subwork.dir <- paste(work.dir,"/Pictures",sep="")
#Assignment of the working directory and conservation in a vector
setwd(subwork.dir)
wd <- getwd()
#Research of all *.png files in the working directory. Compilation of all filenames in a
single vector.
filenames = list.files(pattern = ".png")
data <- as.vector(sub('\\.png$', '', filenames))
id <- c(1:length(data))
#Creation of buffer_vector vector to
buffer_vector<-as.data.frame(cbind(id))
#Creation of a "for" loop to randomly order filter picture with new ID.
tirage<-c()
donnee_export<-c()
tirage<-sample(id) #Random repartition of filter pictures
donnee_export<-as.data.frame(cbind(tirage,data)) #Assignment of a random N°
donnee_export$tirage<-as.numeric(donnee_export$tirage)
donnee_export<-donnee_export[order(donnee_export$tirage),] #Ordering by
df<-as.data.frame(donnee_export) #ascending order
buffer_vector<-cbind(buffer_vector,df[,2])
l_tirage<-length(tirage)
adress_phot<-c()

  for (i in 1:l_tirage)
  {
    adress_phot[i]<-paste(wd,"/",df[i,2],".png",sep="") #Assignment
  } #of the good picture

doc<-pptx() #Creation of a *.pptx file.

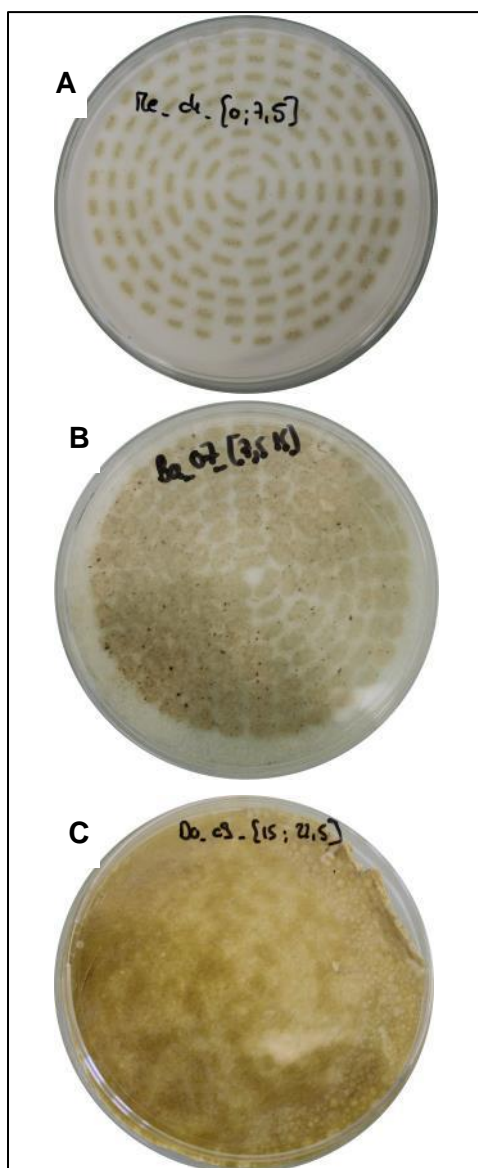
  for (i in 1:l_tirage)
  {
    doc <- addSlide(doc, "Title and Content")
    doc <- addTitle(doc,paste(i,sep=""))
    addImage(doc,as.character(adress_phot[i]),height = 6.6929134, width = 9.0551181)
  }

  # Inclusion of the picture
doc_names<-paste("Notation file.pptx",sep="") # Creation of notation file name

#File writing
setwd(work.dir)

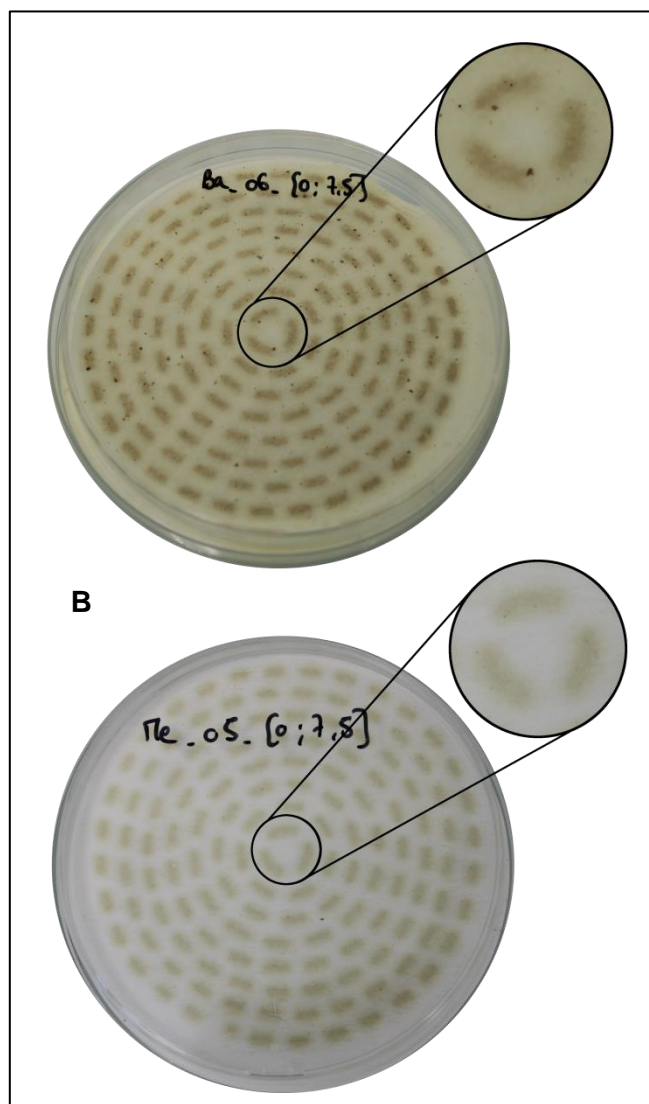
writeDoc(doc,file = doc_names)
write.table(df,paste("Correspondances.xls",sep=""), sep="\t", row.names=FALSE)
```

Supplemental Figure 1: Illustrations of filters noted as “Yes”, “No But” and “No”.



Pictures of filters A,B and C respectively corresponding to indiv. 4 of the [0 g; 7.5 g] weight class of Whiting (WAT: 5.18g), to indiv. 7 of the [7.5 g; 15 g] weight class of Sea Bass (WAT: 8.32 g) and indiv. 9 of the [15 g; 22.5 g] weight class of Sea Bream (WAT: 20.26 g). Pictures of filters A, B and C respectively illustrate a notation of “Yes”, “No but” and “No”.

Supplemental Figure 2: Comparison of filters with and without “fatty” layer.



Pictures of filters A and B respectively correspond to indiv. 6 of the [0 g; 7.5 g] weight class of Sea bass (WAT: 5.41 g), and indiv. 5 of the [0 g; 7.5 g] weight class of Whiting (WAT: 5.52 g). Pictures of filters A and B respectively illustrate a filter with the layer identified as “fatty layer” and without the layer.

II Optimisation, performances et application d'une méthode de Pyrolyse-GC/MS pour caractériser les microplastiques

II.1 Introduction

Cette partie sur l'optimisation, l'évaluation des performances et l'application d'une méthode Py-GC/MS pour identifier les MP a été publiée dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (**Article 4**) :

Hermabessiere, L., Himber, C., Boricaud, B., Kazour, M., Amara, R., Cassone, A.-L., Laurentie, M., Paul-Pont, I., Soudant, P., Dehaut, A., Duflos, G., 2018. Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 6663-6676. doi : <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1279-0>

Les objectifs de ce travail étaient (i) d'optimiser une méthode de Py-GC/MS pour identifier avec certitude des polymères de plastiques, (ii) de déterminer les performances de la méthode optimisée, (iii) de comparer les identifications obtenues en Py-GC/MS avec celles obtenues en micro-spectroscopie Raman et (iv) d'appliquer cette méthode à des échantillons provenant de l'environnement.

Dans un premier temps, l'optimisation de la méthode de Py-GC/MS a été réalisée pour la température de pyrolyse, le programme de température du four de la GC⁴ et le ratio de split⁵ en combinaison avec la température de l'injecteur. Pour la température de pyrolyse, 4 températures différentes (500, 600, 700 et 800°C) ont été testées en pyrolysant des billes de PE et en étudiant la réponse des pics caractéristiques de ce polymère. Pour la température du four de la GC, 3 programmes ont été testés sur la résolution (séparation) des pics caractéristiques de PE. Le ratio de split en combinaison avec la température d'injecteur ont été expérimentés sur la réponse des pics caractéristiques du PE et du PS à travers 9 combinaisons différentes (3 ratio de split x 3 températures d'injecteur). Dans un second temps, pour évaluer la performance de la méthode optimisée, la répétabilité et la précision ont été évaluées pendant 6 semaines de manière qualitative (identification) et quantitative (aire des pics caractéristiques) pour les polymères suivants : PE, PS et PMMA. Ensuite, les limites de détections (LOD) ont été évaluées (en µg) pour 8 polymères communément trouvés dans

⁴ Température programmable permettant de séparer les composés cibles avec des temps de rétention plus ou moins longs.

⁵ Permet de faire varier la quantité injectée en tête de colonne.

l'environnement marin : PE, PP, PS, PMMA, PET, uPVC, PA-6 et PC. De plus, les identifications de MP obtenues avec la méthode de Py-GC/MS ont été comparées à celles obtenues en spectroscopie μ -Raman afin d'évaluer les différences entre ces techniques couramment utilisées pour identifier les polymères de MP. Finalement, la méthode optimisée a été appliquée sur des MP, incluant des fragments, des fibres et des pigments provenant de différentes matrices environnementales (eau de surface, bivalves et sédiments).

II.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 4

L'optimisation a permis de mettre en évidence que la température de pyrolyse optimale est de 700°C en comparaison avec les températures de 500, 600 et 800°C. En effet, avec une augmentation de la température de 500 à 700°C, l'aire des pics caractéristiques du PE augmente également mais celle-ci diminue lorsque la température atteint 800°C. Concernant la programmation du four de la GC, la séparation des pics du triplet du PE est meilleure lorsque la montée en température du programme est diminuée à 13°C/min. Le programme pour le four de la GC sélectionné est le suivant : 2 min à 40°C, augmentation de la température jusqu'à 261°C à 13°C/min puis augmentation à 10°C/min jusqu'à 300°C maintenu 5 min. Globalement, la diminution du ratio de split augmente de manière significative l'aire des pics caractéristiques du PE et du PS et ceux-ci sont encore plus importants lorsque la température d'injecteur est réglée à 300°C en comparaison avec 280 et 320°C (Figure 18). Pour les aires des pics caractéristiques du PS et du PE, une injection avec une température d'injecteur de 300°C et un split de 5 est la combinaison permettant d'avoir le signal le plus intense pour ces deux polymères.

L'analyse des performances de cette méthode optimisée a permis de mettre en évidence que la méthode de Py-GC/MS est répétable et précise d'un point de vue qualitatif car celle-ci a permis une bonne identification des polymères (similarité > 90%) pendant 6 semaines consécutives. D'un point de vue quantitatif, la méthode optimisée est répétable pour le PE et le PMMA mais pas pour le PS à cause d'une forte variabilité des aires intégrées pour un pic caractéristique. Néanmoins, l'équipement n'a pas été stable quantitativement au cours du temps car une diminution de l'aire des pics caractéristiques du PE, PS et PMMA a été observée pendant la dernière semaine. Cette diminution entraîne une élévation importante des coefficients de variation qui dépassent le seuil fixé à 20%. Cependant, d'un point de vue qualitatif, la méthode optimisée a permis d'identifier correctement les trois polymères testés et ceci pendant la durée des 6 semaines consécutives. Le calcul des LOD pour cette méthode montre que la technique est applicable pour des particules pesant moins de 1 μ g. Il est

important de noter que cette technique nécessite une manipulation manuelle pour introduire l'échantillon dans la cupule d'analyse et qu'ici le facteur limitant est le manipulateur. La taille minimale manipulable est estimée à 50 μm , pour un fragment ou une sphère. Ici, des développements méthodologiques utilisant des techniques d'introduction automatique de l'échantillon ou d'introduction en phase liquide dans la cupule d'analyse permettront de diminuer cette taille. La comparaison d'identification entre la spectroscopie μ -Raman et la Py-GC/MS a été concluante car 100% des MP préalablement identifiés avec la spectroscopie micro-Raman ont été identifiés de la même manière en Py-GC/MS (Figure 18).

L'application de cette technique sur des MP provenant de différentes matrices de l'environnement marin (eau de surface, sédiments et organismes) a été concluante. En effet, 100% des fragments, 20% des fibres et 70% des pigments ont été correctement identifiés comme des polymères plastiques. L'identification par Py-GC/MS des pigments qui n'étaient pas identifiés en utilisant la spectroscopie μ -Raman démontre que les différentes techniques d'identification de MP sont complémentaires (Figure 18).

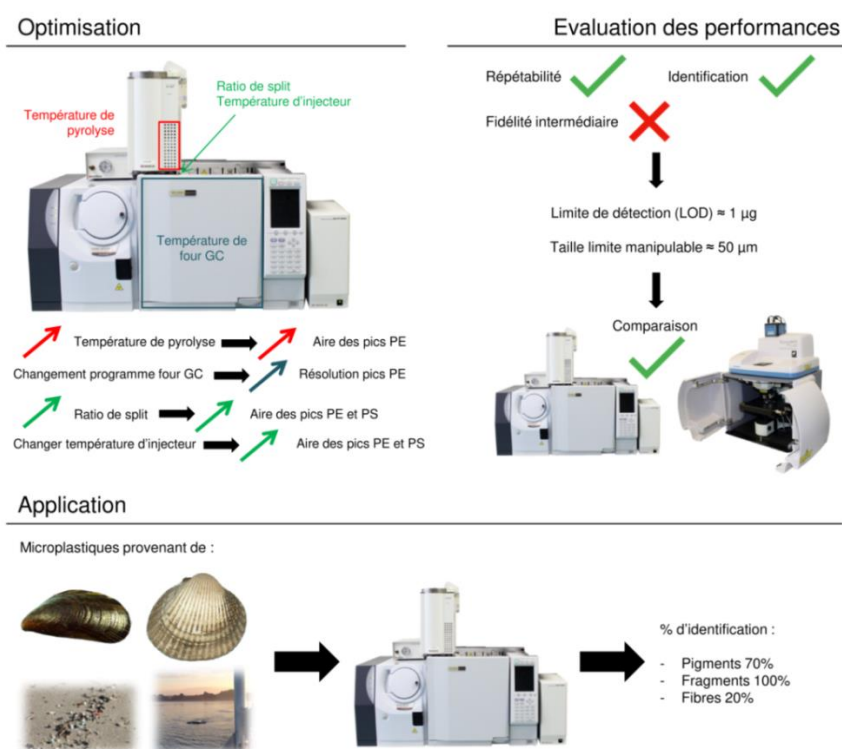


Figure 18 : Démarche expérimentale de l'optimisation, de l'évaluation des performances et de l'application d'une méthode de Pyrolyse-GC/MS pour identifier des microplastiques.

II.3 Article 4 : Optimization, performance and application of a Pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics

Optimization, performance and application of a Pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics

Ludovic HERMABESSIERE^a, Charlotte HIMBER^a, Béatrice BORICAUD^a, Maria KAZOUR^{b,c}, Rachid AMARA^b, Anne-Laure CASSONE^d, Michel LAURENTIE^e, Ika PAUL-PONT^d, Philippe SOUDANT^d, Alexandre DEHAUT^{a,1} & Guillaume DUFLOS^{a,1*}

^a ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne, France

^b Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Univ. Lille, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, 32 Avenue Foch, Wimereux, France

^c CNRS, National Centre for Marine Sciences, PO Box 534, Batroun, Lebanon.

^d 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

^e ANSES, Plateforme PAS, Laboratoire de Fougères, 10 B rue Claude Bourgelat, Javené, 35300 Fougères, France

¹ These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author:



guillaume.duflos@anses.fr

+33 3 21 99 25 00

Graphical abstract

1. Optimization



PE  and PS 

Pyrolysis temperature: 700 °C

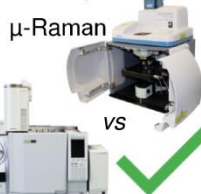
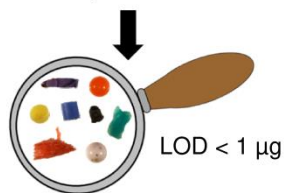
Split ratio: 5

Injector temperature: 300 °C

2. Validation

 Repeatability

 Intermediate precision



3. Application

Particles from:



% Identification: - Pigment: 70 %
- Fiber: 20 %
- Fragment: 100 %

Abstract

Plastics are found to be major debris composing the marine litter, microplastics (MP, <5 mm) being found in all marine compartments. Microplastics number tends to increase with decreasing size leading to a potential misidentification when only visual identification is performed. These last years, pyrolysis coupled with gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) has been used to get information on the composition of polymers with some applications on microplastics identification. The purpose of this work was to optimize and then validate a Py-GC/MS method, determine limit of detection (LOD) for eight common polymers, and apply this method on environmental MP. Optimization on multiple GC parameters was carried out using polyethylene (PE) and polystyrene (PS) microspheres. The optimized Py-GC/MS method require a pyrolysis temperature of 700 °C, a split ratio of 5 and 300 °C as injector temperature. Performance assessment was accomplished by performing repeatability and intermediate precision tests and calculating Limit of Detection (LOD) for common polymers. LOD were all below 1 µg. For performance assessment, identification remains accurate despite a decrease in signal over time. A comparison between identifications performed with Raman micro spectroscopy and with Py-GC/MS was assessed. Finally, the optimized method was applied to environmental samples, including plastics isolated from sea-water surface, beach sediments, and organisms collected in the marine environment. The present method is complementary to µ-Raman spectroscopy as Py-GC/MS identified pigment containing particles as plastic. Moreover, some fibers and all particles from sediment and sea-surface were identified as plastic.

Keywords

Microplastics, Pyrolysis, Gas-chromatography, method, environmental samples

1. Introduction

Plastic is a commonly used material as it is inexpensive, strong, lightweight, and easy to manufacture (Thompson *et al.*, 2009). Plastic production increased from the 1950's and reached 335 million metric tons in 2016 (PlasticsEurope, 2018). Due to waste management issues and incivilities, it has been estimated that 5 to 12 million plastic particles end up in Oceans in 2010 (Jambeck *et al.*, 2015). Low estimates predicted that floating marine plastic weight between 70,000 and 270,000 tons (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015), thus, potentially representing more than 51 trillion plastic pieces in Oceans (van Sebille *et al.*, 2015).

Microplastics (MP) are plastic particles smaller than 5 mm in their longest size (Arthur *et al.*, 2009). To date, multiple studies are carried out to quantify MP in sediments, in water column, and in organisms from both freshwater and marine environments (Horton *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016c). For large MP (1-5 mm) (Imhof *et al.*, 2012) and macroplastic (>5 mm), visual identification relying on physical characteristics is possible but the proportion of misidentification grows with decreasing particles size (Lenz *et al.*, 2015). However, some studies still do not perform any characterization of MP based on their chemical composition (Shim *et al.*, 2017). Additionally, as plastic materials include a large variety of polymers, more than 5,000 grades (CAMPUS, 2018), chemical identification is now mandatory to ensure the accuracy of collected pollution data (Remy *et al.*, 2015). Raman and Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopies are the most common techniques employed to identify polymer types of MP (Rocha-Santos et Duarte, 2015). Furthermore, the use of imaging techniques coupled to spectroscopic approaches allows automatization of MP identification (Frère *et al.*, 2016; Oßmann *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b). In addition to spectroscopic methods, another type of chemical identification is thermal analysis (Shim *et al.*, 2017). Pyrolysis-Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (Py-GC/MS) is one of

the thermal analysis techniques used to identify MP polymers. Py-GC/MS has been used to identify MP from different matrix based on their thermal degradation products (Ceccarini *et al.*, 2018; Dekiff *et al.*, 2014; Fabbri *et al.*, 2000; Fischer et Scholz-Böttcher, 2017; Fries *et al.*, 2013; Hendrickson *et al.*, 2018; Nuelle *et al.*, 2014). Furthermore, Py-GC/MS allows the analysis of a whole MP particle in contrast with Raman or FTIR (in reflection mode) which only analyze the surface of the MP particle being sensitive to interference caused by additives such as pigments (Schymanski *et al.*, 2018; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015), for example.

To date, studies using Py-GC/MS to identify the polymeric composition of MP document neither the method development nor the assessment of its performance. Some authors stated that Py-GC/MS is only feasible with MP >500 μm (Ivleva *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018b) even if so far, 100 μm is the smallest size of an isolated MP that has been identified (Dekiff *et al.*, 2014). Recently, particles smaller than 1 μm , referred as nanoplastics by the authors, have been identified as plastics based on Py-GC/MS and statistical approaches in bulk samples from the North Atlantic Subtropical Gyre (Ter Halle *et al.*, 2017).

The purpose of this work was fourfolds: (i) optimize a Py-GC/MS method to accurately identify polymer of MP, (ii) assess the performance of the Py-GC/MS approach, (iii) compare identifications with samples already identified by μ -Raman and (iv) apply this technique to environmental samples.

2. Material and methods

2.1. Reference material

Microspheres with calibrated size ranges were purchased for the Py-GC/MS optimization method. Polyethylene (PE) (180-212 μm ; reference: CPMS-0.96 180-212 μm) and Poly(Methyl Methacrylate) (PMMA) (180-212 μm ; reference: PMMAMS-1.2 180-212 μm) microspheres were acquired from Cospheric LLC (Santa Barbara, USA) and Polystyrene (PS) (106-

125 µm; reference: 198241) from Polysciences Europe GmbH (Hirschberg an der Bergstrasse, Germany). For the calculation of the LOD, other polymers were bought from Goodfellow (Lille, France) including filaments of polycaprolactam (PA-6), polyethylene terephthalate (PET) and polypropylene (PP) and fragments of polycarbonate (PC) and unplasticized polyvinyl chloride (uPVC).

For all polymers, characteristic compounds are presented in Table 1 (see Electronic Supplementary Material Figure S1 to S8) and were chosen according to their representativeness for polymer identification, their relative intensity, and in comparison with the literature (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017; Kusch, 2016; Tsuge *et al.*, 2011).

2.2. Sample preparation

Each particle was selected based on its size (ca. 200 µm) under a SZ61 stereomicroscope (Olympus, Rungis, France) and then introduced into an analysis cup (Frontier-Lab, Fukushima, Japan) for Py-GC/MS analysis. All analysis cups used in this work were brand new cups visually controlled prior to analysis to detect any possible contamination.

2.3. Size and weight estimation

In order to estimate the size of the particle, a photograph was taken with a scale bar using a DP21 camera (Olympus, Rungis, France) mounted on the stereomicroscope. The size in pixel of the particle was recorded using GIMP 2 software (2.8.16). Then, the maximum size in µm of the particle was calculated using the scale bar. For each particle, the volume (cm³) was estimated using different formula (1), (2) or (3), where D corresponds to the diameter, L to the length and S to the side size (see Electronic Supplementary Material Weight estimation). The volume was then multiplied by the density (g/cm³) of the polymer to obtain the estimated weight.

$$(1) \text{ Microsphere volume} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

$$(2) \text{ Filament volume} = \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times \pi \times L$$

$$(3) \text{ Fragment volume} = S^2 \times L$$

Table 1 Polymer related pyrogram information

Polymer	Characteristic compound ^a	LRI ^b	Indicator ion (m/z)
PE	1-Nonene (C9)	893	83; 97
	1-Decene (C10)	993	83; 97
	1-Undecene (C11)	1093	83; 97
	1-Dodecene (C12)	1192	83; 97
	1-Tridecene (C13)	1292	83; 97
	1-Tetradecene (C14)	1392	83; 97
	1-Pentadecene (C15)	1492	83; 97
	1-Hexadecene (C16)	1578	83; 97
PS	Styrene	898	78; 104
	3-butene-1,3-diylidibenzene (styrene dimer)	1733	91; 208
PMMA	Methyl methacrylate	743	41; 69; 100
PP	2,4-dimethyl-1-heptene	846	70
PA-6	ε-caprolactam	1274	113
PC	Phenol	980	66; 94
	p-Cresol	1075	77; 107
	p-Ethylphenol	1168	107; 122
	p-Vinylphenol	1217	91; 120
	p-Isopropenylphenol	1304	119; 134
	Bisphenol A	2088	213; 228
PET	Benzene	770	52; 78
	Acetophenone	1076	51; 77; 105
	Vinyl benzoate	1145	52; 77; 105
	Benzoic acid	1178	77; 105; 122
	Divinyl terephthalate	1574	104; 175
uPVC	Benzene	770	52; 78
	Toluene	782	91
	Styrene	898	78; 104
	Indene	1059	116
	Naphthalene	1206	128
	2-methylnaphthalene	1320	115; 142
	1-methylnaphthalene	1340	115; 142

^a Marker compounds in bold were used to calculate Limit of Detection;

^b Retention Index were calculated according to [van Den Dool et Kratz \(1963\)](#); m/z: mass to charge ratio

2.4. Method optimization

2.4.1. Initial Py-GC/MS method

The hereafter called “initial method” was described by [Dehaut *et al.* \(2016\)](#). Briefly, the analysis cup containing the plastic was placed on the AS-1020E autosampler of an EGA/PY-3030D device (Frontier Lab, Fukushima, Japan). Samples were pyrolysed at 600 °C for 1 min. Pyrolysis products were injected with a split of 20, on a GC-2010 device (Shimadzu, Noisiel, France) equipped by a RXi-5ms® column (60 m, 0.25 mm, 25 µm thickness) (Restek, Lisses, France). Temperatures of the pyrolyzer interface and the injection port were both set at 300 °C. Helium was used as a carrier gas with a linear velocity of 40 cm/s. The initial oven program, called here after program 0, was set as follows: 40 °C for 2 min, then increase to 320 °C at 20 °C/min, maintained for 14 min. Mass spectra were obtained by a Shimadzu QP2010-Plus mass spectrometer. Interface temperature was set at 300 °C, ion source temperature was set at 200 °C, ionization voltage was set at 70 eV, and a mass range from 33 to 500 m/z was scanned at 2000 Hz.

As a primary attempt, polymer identification was realized using total ion pyrogram (TIC) which was firstly 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 (minimum value of 80%) between average mass spectra on the whole chromatogram. Our home-made database was created using our “initial method” and the optimized Py-GC/MS method on plastic references from Goodfellow (Lille, France). Plastic references used for our home-made database included: PE, PS, PP, PET, PA-6, PC, PMMA and uPVC.

When identification was not possible after primary attempt, a classical GC/MS treatment was performed. Peaks of pyrograms were integrated and compared with available literature ([Tsuge *et al.*, 2011](#)) or characteristic compounds

(Table 1), single peak identification being carried out using NIST08 database and LRI.

2.4.2. Pyrolysis temperature

Optimization of the pyrolysis temperature was carried out using the initial pyrolysis method. The impact of pyrolysis temperature was determined using five replicate of PE microspheres. Three additional pyrolysis temperatures were tested: 500, 700 and 800 °C for 1 min.

2.4.3. GC oven temperature program

In addition to Program 0, two others temperature programs were tested. Program 1 was set as follow: 40 °C for 2 min, then increase to 200 °C at 15 °C/min followed by a second increase to 300 °C at 10 °C/min maintained for 2 min. Program 2 was set as follow: 40 °C for 2 min, then increase to 261 °C at 13 °C/min followed by a second increase to 300 °C at 6 °C/min maintained for 2 min. Except pyrolysis temperature was set at 700 °C the optimal temperature for 1 min (cf. 3.1.1), oven program was the unique parameter modified in this part, other parameters were conserved as those of the initial method. The impact of GC oven temperature program on resolution was determined using PE microspheres. Here the resolution was only used to assess the separation between PE alkene and alkadiene. The resolution of alkenes (from C9 to C16) was used to evaluate each program performance. Resolution was calculated by the Shimadzu GC-MS post-run analysis software using (4), where T_r corresponds to the retention time of the considered peak (Alkene), T_{rp} to the retention time of the previous peak (Alkadiene), W to the width of the considered peak and W_p to the width of the previous peak:

$$(4) \text{ Resolution} = 2 \times \frac{T_r - T_{rp}}{W + W_p}$$

Five replicates were performed per programs.

2.4.4. Injector temperature and split ratio

Optimization on the split ratio and injector temperature was performed using PE and PS microspheres. Here, PS was used in addition to PE as this polymer exhibits only a few degradation products after pyrolysis (Table 1). Three split ratios (50, 20 and 5) and three injector temperatures (280, 300 and 320 °C) were applied, resulting in nine distinct combinations. For all combinations, pyrolysis temperature and GC oven program were set following the previous optimization steps, others parameters were conserved as those described for the initial method (cf. 2.4.1). For each combination, five microspheres of PE and PS were analyzed.

2.5. Method performance evaluation

Split ratios were adjusted to ensure that no saturation of the mass spectrum occurred. To do so, split ratio was set at 5 for PE microspheres, particles identified by μ -Raman spectroscopy, and unknown particles injection, whereas for PMMA and PS microspheres injection, a split of 50 was chosen.

2.5.1. Repeatability and intermediate precision

For repeatability and intermediate precision, respectively ten and five microspheres of the three polymers were pyrolysed and the Relative Standard Deviation (RSD) (5) was calculated for each characteristic peak according to ISO 5725-3 International Organization for Standardization (ISO) (1994) where s is the standard deviation and m is the mean:

$$(5) RSD (\%) = \frac{s}{m} \times 100$$

Intermediate precision was assessed over time with pyrolysis occurring at 3, 4 and 6 weeks after repeatability experiences. The method is considered valid if RSD is below 20 % for repeatability and intermediate precision. Moreover, polymer identification of the particles was performed as previously described (cf. 2.4.1) to obtain qualitative data.

2.5.2. Limit of detection

Limit of detection was calculated according to Caporal-Gautier *et al.* (1992). First, ten analysis cups without plastic, hereafter referred as "blank", were pyrolysed. For each blank and at the retention time of each characteristic peak of the eight used polymers (Table 1), the maximum height was determined over a time interval equal to 20 times the full width at half maximum (FWHM), this area is called H_{20FWHM} . Interval surrounds the retention time of each peak with the retention time being the central point of the time range. Five particles were pyrolysed for each polymer. A response factor (R) (6) was calculated: "Weight" corresponds to the mean the average calculated weight and "Height" corresponds to the mean height of the characteristic peak for the five particles:

$$(6) Response\ factor\ (R) = \frac{Weight}{Height}$$

Finally, for each polymer LOD were calculated as follow:

$$(7) Limit\ of\ Detection\ (LOD)$$

$$= 3 \times R \times H_{20FWHM}$$

2.6. Method comparison

2.6.1. Sampling

Unknown plastic particles were first analysed by μ -Raman and then by Py-GC/MS before identification to be compared. Comparison of the identification of unknown plastic particles obtained after μ -Raman spectroscopy and Py-GC/MS was performed. To assess methods comparison, fifty plastic particles hand sampled on a local beach (Equihen Plage, France – 50°39'51.08"N, 1°34'17.94"E) were used.

2.6.2. Identification by μ -Raman and Py-GC/MS

For μ -Raman analysis, each particle was analyzed with an XploRA PLUS V1.2 (HORIBA Scientific, France SAS) equipped with two lasers of 785 and 532 nm wavelength. First, plastic particles were analyzed with laser wavelength set

at 785 nm over a range of 50 to 3,940 cm^{-1} with a $\times 10$ (NA=0.25; WD=10.6 mm) or $\times 100$ (NA=0.9; WD=0.21 mm) objective (Olympus, France). If identification with the 785 nm laser was not successful, particles were secondly analyzed with a laser wavelength set at 532 nm over a range of 50 to 4,000 cm^{-1} with a $\times 10$ or $\times 100$ objective. The experimental conditions (integration time, accumulation, laser power) were adapted to limit fluorescence and increase the spectral quality of the analyzed particles. Polymer identification was carried out using spectroscopy software (KnowItAll, Bio-Rad) and our own database containing pre-established polymers spectra. Identification was considered correct if Hit Quality Index (HQI) was above 80 (ranging from 0 to 100). If identification of a particle was not successful after μ -Raman spectroscopy, the particle was then included in the section 2.7.

For Py-GC/MS, a piece of each particle was cut to the smallest possible size and prepared as indicated in section 2.2. Pyrolysis-GC/MS was realized as described above (cf. 2.5).

2.7. Application: identification of unknown particles

2.7.1. Sampling

Application of the Py-GC/MS was performed using particles collected on a beach, extracted from bivalves and collected on sea surface waters.

Ten particles, collected by hand on a local beach, including 4 particles identified as pigment and 6 particles unidentified (cf. 3.3) were analyzed using Py-GC/MS.

Mussels (*Mytilus edulis*) and cockles (*Cerastoderma edule*) were respectively sampled during morning low tides at Le Portel, France (50°42'30.02"N, 1°33'34.43"E) on 10/29/2015 and at Baie d'Authie, France (50°22'17.22"N, 1°35'4.8"E) on 11/15/2015. Bivalves were then dissected, digested, and filtered using the method of [Dehaut et al. \(2016\)](#). Particles resembling plastic found in bivalves were extracted under a stereomicroscope using tweezers and submitted to μ -Raman identification using an LabRam

HR800 (HORIBA Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) following a methodology adapted from [Frère et al. \(2016\)](#). Here, 16 particles from bivalves, previously identified as pigments containing particles, and 10 unknown particles in form of fibers were analyzed. Finally, 24 unknown particles collected in sea-surface trawls from the bay of Brest, as described by [Frère et al. \(2017\)](#), were used for identification by Py-GC/MS.

2.7.2. Identification by Pyrolysis-GC/MS

In total, sixty particles with no previous polymer identification were analyzed. For Py-GC/MS, a piece of each particle was cut to the smallest size possible and prepared as indicated in section 2.2. Pyrolysis-GC/MS was realized as described above (cf. 2.5). Results will be present and discuss according to the following categories: pigments containing particles, fibers and others particles.

2.8. Statistical analyses

All statistical analyses with an exception for RSD calculation were performed using R (3.4.0) ([R Core Team, 2015](#)). For method optimization, including verification of estimated size of microspheres used, normality and homoscedasticity of the distribution hypothesis were carefully verified before performing ANOVA. Assuming one of the hypothesis was not verified, a Kruskal-Wallis test was carried out. Kruskal-Wallis tests were followed by a conservative post-hoc test using the Fisher's least significant difference (LSD) criterion and Bonferroni correction. Post-hoc tests were performed using the agricolae package (1.2-7) ([De Mendiburu, 2014](#)). All results are expressed as a mean \pm 2 standard error (S.E), representing the 95% confidence interval (95% CI). Differences were considered significant when p -value <0.05 . On bar charts, two different letters illustrates significantly different value with a 95% CI.

3. Results and discussion

All procedural blank, *i.e.* analysis cup without sample, presented no sign of contamination by pyrolytic products of synthetic polymers.

3.1. Method optimization

3.1.1. Pyrolysis temperature

PE microspheres size (204 to 214 μm) used for optimizing the pyrolysis temperature were not significantly different for each tested temperatures (One-way ANOVA, $p > 0.05$). Pyrolysis temperature (500, 600, 700 and 800 $^{\circ}\text{C}$) had a significant impact on the peaks areas of PE (Fig. 1). On the one hand, for the eight characteristic compounds of PE, peaks areas rises when the pyrolysis temperature increase from 500 to 700 $^{\circ}\text{C}$ but on the other hand at 800 $^{\circ}\text{C}$, peaks areas slightly decreased (Fig. 1). Moreover, significant difference of areas were recorded for characteristic compounds of PE (Kruskal-Wallis,

$p < 0.05$). Areas were significantly higher at 700 $^{\circ}\text{C}$ in comparison with areas at 500 $^{\circ}\text{C}$ (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – Fig. 1). Significant differences between areas at 600 and 700 $^{\circ}\text{C}$ were observed for 1-Nonene, 1-Decene, 1-Undecene, 1-Dodecene, and 1-Tridecene (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – Fig. 1). However, no significant difference was observed between 500 and 600 $^{\circ}\text{C}$, between 700 and 800 $^{\circ}\text{C}$, and between 600 and 800 $^{\circ}\text{C}$ for all 8 characteristics compounds (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – Fig. 1). At 800 $^{\circ}\text{C}$, pyrograms of PE microspheres were not all typical with the presence of unknown compounds at the beginning of the pyrogram which lead to identification with a percentage below 80 % (see Electronic Supplementary Material Figure S9). As 700 $^{\circ}\text{C}$ demonstrated higher areas for characteristic compounds of PE with typical and clearly identified pyrograms; optimal pyrolysis was then set at 700 $^{\circ}\text{C}$.

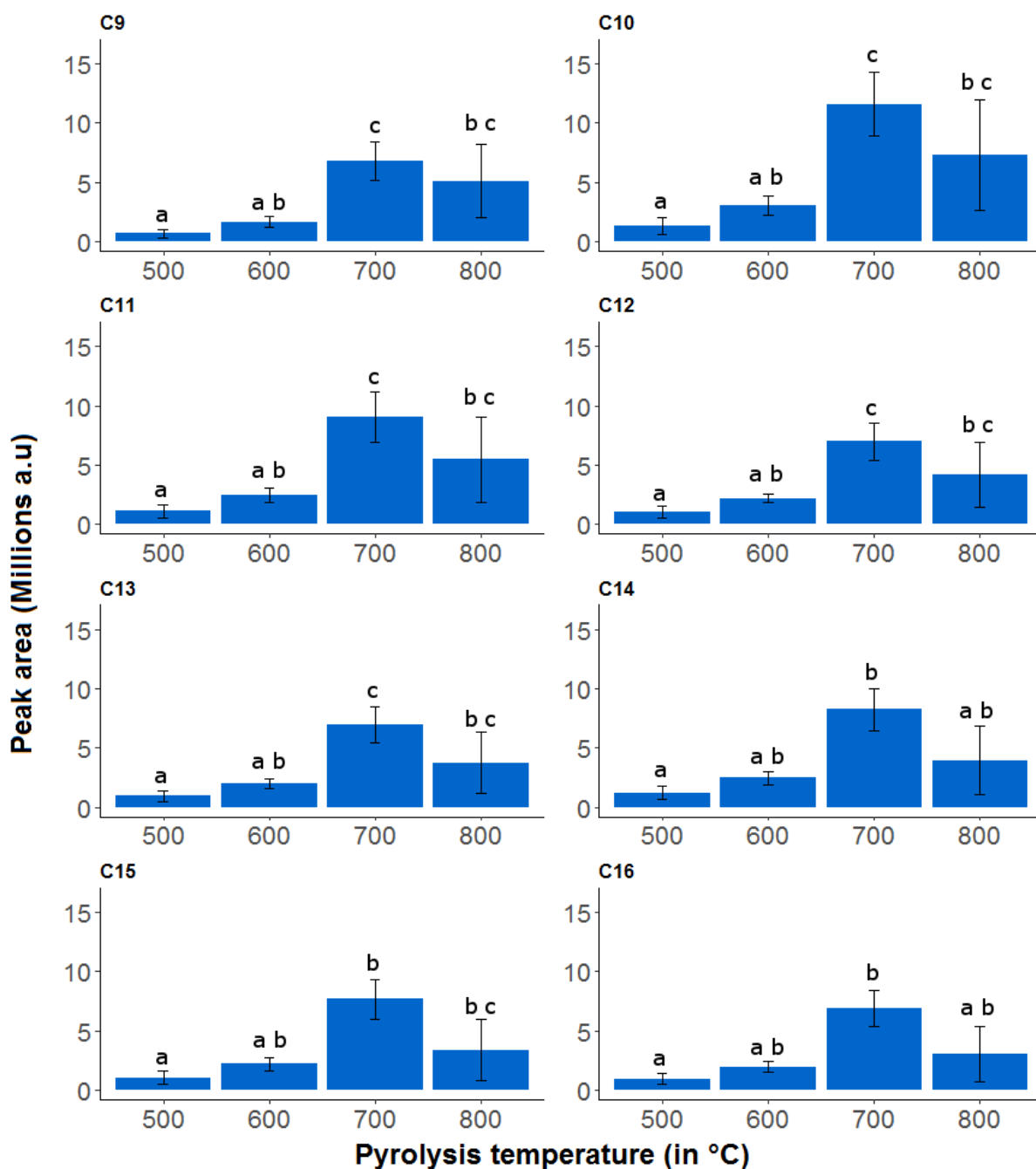


Fig. 1 Peaks areas (Arbitrary Unit) depending on the Pyrolysis temperature (in °C) for eight characteristic compounds of PE. Values as expressed as mean \pm 95 % confidence interval. Letters correspond to the differences after post-hoc test using the Fisher's least significant difference with Bonferroni correction. C9: 1-Nonene; C10: 1-Decene; C11: 1-Undecene; C12: 1-Dodecene; C13: 1-Tridecene; C14: 1-Tetradecene; C15: 1-Pentadecene; C16: 1-Hexadecene

Regarding the literature, studies generally used a pyrolysis temperature of 700 °C (Dekiff *et al.*, 2014; Fabbri *et al.*, 2000; Fries *et al.*, 2013; Kusch, 2016; Nuelle *et al.*, 2014; Ter Halle *et al.*, 2017) while others used lower temperature such as 550 °C (Hendrickson *et al.*, 2018), 590 °C (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017), 600 °C (Dehaut *et al.*, 2016; Tsuge *et al.*, 2011) or 650

°C (Ceccarini *et al.*, 2018). As presented in this work, pyrolysis temperature had a clear impact on the signal of the pyrolytic products of PE and could potentially impact identification for small particles. Additionally, pyrolysis at a temperature greater than or equal to 800 °C had a negative effect on PE pyrolytic products. Indeed, the signal was decreased and the polymer

identification was not possible with our software due to the presence of a large interfering peak at the beginning of the pyrogram (see Electronic Supplementary Material Figure S9). Moreover, as indicated by Kusch (2016), pyrolysis temperature could also impact the generated pyrolysis products. Here for PC, PET, and uPVC some pyrolysis products were different from those recorded with the initial Py-GC/MS method (Dehaut *et al.*, 2016) and from a reference book (Tsuge *et al.*, 2011). Such differences could prevent identification of these polymers as many libraries were obtained after pyrolysis at 600 °C. However, the use of our own database create with pyrolysis temperature set at 700 °C allow accurate polymer identification.

3.1.2. GC oven temperature program

PE microspheres size (197 to 226 µm) used for the optimization of the GC oven temperature program were not significantly different for each tested conditions (One-way ANOVA, $p > 0.05$). For all characteristic compounds of PE and for the three GC oven temperature programs, resolution was above 1.5 (see Electronic Supplementary Material Figure S10) which is acceptable (McGuffin, 2004). Significant differences in resolution were observed for all peaks of PE (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) depending on the used GC oven temperature program. Moreover, program 2 demonstrated higher resolution in comparison with program 0 and 1

(Kruskal-Wallis followed by Fisher's LSD with Bonferroni correction, $p < 0.05$ – see Electronic Supplementary Material Figure S10). Here, resolution and peak separation was higher when ramping temperature decrease. Higher peak resolution could be useful for manual identification of peaks, if primary attempt using F-Search software is not conclusive. Program 2 was then applied to perform separation of pyrolysis compounds using the GC system.

3.1.3. Injector temperature and split ratio

PS (110 to 136 µm) and PE (188 to 223 µm) microspheres size used for the optimization on split ratio and injection temperature were not significantly different for each tested conditions (One-way ANOVA, $p > 0.05$). For all characteristic compounds of PE, areas significantly decreased with the increase of split ratio (Kruskal-Wallis followed post-hoc, $p < 0.05$ – Fig. 2). Moreover, no significant difference in peaks areas were observed at split ratio of 20 and 50 depending on the injector temperature used (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). However, it should be noticed that significant differences between injection at 280, 300, and 320 °C were observed using a split ratio of 5 for all characteristic compounds (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – Fig. 2). Indeed, with the exception of 1-Nonene, the highest peaks areas were obtained when injector temperature was set at 300 °C with a split ratio of 5 (Fig. 2).

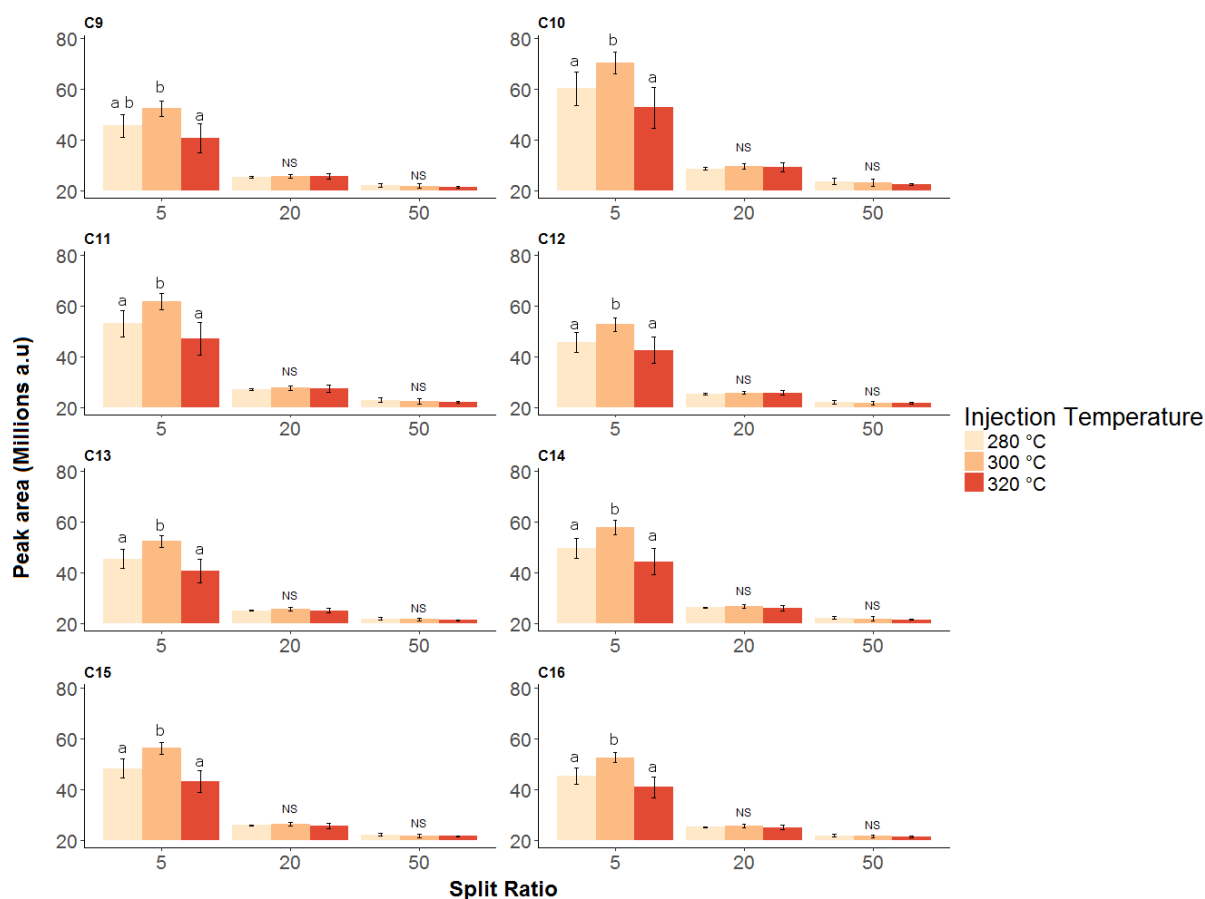


Fig. 2 Peaks areas (Arbitrary Unit) depending on the split ratio and injection temperature for 8 characteristics compounds of PE. Values as expressed as mean \pm 95 % confidence interval. Letters correspond to the differences after post-hoc test using the Fisher's least significant difference with Bonferroni correction and NS stand for non-significant. C9: 1-Nonene; C10: 1-Decene; C11: 1-Undecene; C12: 1-Dodecene; C13: 1-Tridecene; C14: 1-Tetradecene; C15: 1-Pentadecene; C16: 1-Hexadecene

For PS, as for PE, increasing split ratio decreased peaks areas (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$ – see Electronic Supplementary Material Figure S11). For styrene, at a split ratio of 5, areas were significantly different between 320 °C and the others temperatures (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – see Electronic Supplementary Material Figure S11) and at a split ratio of 20, areas were significantly different between 280 and 320 °C (Kruskal-Wallis followed by post-hoc, $p < 0.05$ – see Electronic Supplementary Material S11). However, no significant difference were observed for area values at a split ratio of 50 between injector temperatures (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). No significant difference were observed for styrene dimer areas between injector temperatures at each split ratio (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). As split ratio is inversely related to the amounts of sample entering the column, such results were expected. Generally, studies using

Py-GC/MS to identify MP used low split ratio to increase analyte signal. Indeed, splitless mode was used for injection by several authors (Dekiff *et al.*, 2014; Fries *et al.*, 2013; Hendrickson *et al.*, 2018; Nuelle *et al.*, 2014) while split ratio of 10 (Ceccarini *et al.*, 2018) or 15 (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017) were used by others authors. In several works, split ratio was adapted depending on the weight of the particle to identify (Hendrickson *et al.*, 2018; Ter Halle *et al.*, 2017). Indeed, Ter Halle *et al.* (2017) used a split ratio of 5 for nanoplastics (25 mg of lyophilizate), 10 for micrometric plastic (particle on filter) and 100 for meso and microplastics and commercial plastics (approximately 10 μg). In addition, in their work Hendrickson *et al.* (2018) used the splitless mode for particles $< 20 \mu\text{g}$ and a split ratio of 100 for particles $> 20 \mu\text{g}$. In the others studies few or no information are available on the size or the weight of MP used for Pyrolysis

(Ceccarini *et al.*, 2018; Dekiff *et al.*, 2014; Fischer et Scholz-Böttcher, 2017; Nuelle *et al.*, 2014). Here, split ratios tested were between 5 and 50 to be around the split ratio used in our previous work (Dehaut *et al.*, 2016) and in order to obtain area for PE characteristic peak above a million of arbitrary unit allowing correct identification using the software. With this optimized Py-GC/MS method, split ratio should also be adapted depending on the weight of particles. Indeed, for unknown particles smaller than 5 µg a split ratio of 5 should be used and for particles heavier than 5 µg, split ratio should be set at 20. Moreover, injector temperature of 300 °C in combination with split ratio of 5 had a significant effect on peaks areas for all PE's peaks and for styrene from PS (Fig. 2 & see Electronic Supplementary Material Figure S11) which could be important to detect small particles. Here an injection temperature set at 300 °C was chosen for performance assessment purpose.

Globally, method optimization is an important step for the detection and then the identification of MP using Py-GC/MS. Indeed, the higher the signal will be, the higher the probability of identification will be but mass spectrum saturation should be avoided to ensure proper identification. Moreover, MP signal tend to increase with an increasing size of the particle.

3.2. Method performance evaluation

3.2.1. Method repeatability and intermediate precision

PE, PMMA, and PS microspheres used for assessing method repeatability and intermediate precision did not display significant difference in

sizes (One-way ANOVA or Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Firstly, polymer identifications were, over the 6 weeks period, accurate with similarity percentage all above 90 %. Identification was successful in all cases and the method could be considered repeatable within a week and precise over the 6 weeks. Concerning the repeatability RSD, values were below 20 % for the characteristic compounds of PE and PMMA and above 20 % for characteristics compounds of PS (Table 2). For styrene dimer, highly variable peak areas were recorded for repeatability test. In addition RSD value above 20% for styrene was due to one repetition that presents peak area 1.5 higher in comparison with others replicates. Then, concerning intermediate precision RSD values were above 20 % for all characteristics compounds of PE, PS, and PMMA (Table 2). Consequently, the method is repeatable for PE and PMMA but not precise over time for all the three tested polymers, regarding quantitative data. Depending on when the analysis was performed, a high variation in peak areas was recorded and thus was responsible for high values of RSD. Indeed, at weeks 1, 3 and 4, areas of characteristics peaks were in the same order of magnitude (for an example see see Electronic Supplementary Material Figure S12). However at week 6, an important diminution of the signal was observed (see Electronic Supplementary Material Figure S12) which can cause the high variability in RSD values for method intermediate precision. Finally, despite a decrease over time in peaks areas for characteristic compounds of PE, PS and PMMA, identifications remained exact. This is essential for future use of the optimized Py-GC/MS method to identify MP.

Table 2 Relative standard deviation (in %) for method repeatability (n=10) and intermediate precision (n=20) for characteristic compounds of Polyethylene, Polystyrene and Poly(Methyl Methacrylate)

Polymer	Characteristic compound	Repeatability RSD (%)	Intermediate Precision RSD (%)
PE	1-Nonene	10,67	31.82
	1-Decene	9,91	31.34
	1-Undecene	10,01	31.79
	1-Dodecene	9,55	31.40
	1-Tridecene	9,06	33.11
	1-Tetradecene	8,81	30.22
	1-Pentadecene	8,98	30.88
	1-Hexadecene	9,62	30.76
PS	Styrene	22,47	32.57
	3-butene-1,3-diyldibenzene (styrene dimer)	48,03	49.69
PMMA	Methyl methacrylate	9,19	24.34

3.2.2. Limit of Detection

The estimated LOD were below 1 µg for all tested polymers using the optimized Py-GC/MS

(Table 3). Detection of smaller particles of polymers with a few peaks, such as PS or PMMA could be easier compared to PE which presents numerous pyrolysis products.

Table 3 Limit of detection (LOD) for eight common polymer and associate theoretical estimate size of identifiable particle, in the form of sphere, fiber and fragment.

Polymer	LOD (in µg)	Theoretical size		
		Sphere diameter (in µm) ^d	Fiber length (in µm) ^{d e}	Fragment length (in µm) ^{d f}
PE ^a	0.070	51.7	229.9	28.9
PS ^a	0.003	17.7	9.2	1.2
PMMA ^a	0.029	35.9	77.2	9.7
PA-6 ^b	0.110	57.1	309.9	38.9
PP ^b	0.027	38.6	95.5	12.0
PET ^b	0.015	27.4	34.1	4.3
PC ^c	0.116	35.9	77.0	9.7
uPVC ^c	0.592	58.7	366.6	42.3

^a Polymer used in form of microspheres ; ^b Polymer used in form of filaments; ^c Polymer used in form of fragments; ^d LOD in size for sphere. fiber and fragment were calculated based on LOD in weight; ^e Calculation made with a diameter of 20 µm; ^f Calculation made based on a parallelepiped form with 50 µm as side size.

To date, identification of isolated MP using Py-GC/MS was successful for particles with a size down to 100 μm (Dekiff *et al.*, 2014) and down to 0.4 μg (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017). Here, uPVC demonstrated the highest LOD with 0.592 μg . This could be explained by uPVC fragment form and important density. Indeed, uPVC particles were thick ($\approx 310 \mu\text{m}$) and long (195 to 220 μm) leading to heavy particles ($> 20 \mu\text{g}$) due to its important density (1.4 g cm^{-3}) leading to an heavy estimated weight in comparison with other polymers. Globally, polymers with the highest densities, PA-6, PC or uPVC, have the highest LOD (Table 3). In the present study, estimated weight of the particles used for optimization and performance assessment were below 10 μg with the exception of uPVC particles and were even below 1 μg for some polymers (*i.e.* PS and PP). Furthermore, in previous works, Py-GC/MS was successfully applied to identify particles weighting 20 μg (Hendrickson *et al.*, 2018) and below 10 μg (Fischer et Scholz-Böttcher, 2017). Limit of detection expressed in μg were low and demonstrate that this method is applicable to very small and light particles. In addition to LOD in μm , theoretical identifiable size (in μm) were calculated for MP in form of spheres, fibers and fragments for all 8 polymer tested in the present study (Table 3). Those theoretical minimal identifiable sizes were calculated using the LOD expressed in mass, polymer density and equation (1-3) (see Electronic Supplementary Material Weight Estimation). For spheres, all identifiable size were below 60 μm in diameter, for fibers of 20 μm of diameter length size varied from 9.2 μm to 366.6 μm and for fragment all length size were below 50 μm (Table 3). Here, these theoretical sizes showed that fiber are the MP form with the longest size identifiable with the optimized Py-GC/MS. Indeed, fibers are long but thin resulting in an important considered size (as the longest size was selected) with a low estimated weight. Moreover, as Py-GC/MS rely on particles weight, it is an important parameter to master in MP research.

MP are commonly defined as plastic particles smaller than 5 mm (Arthur *et al.*, 2009).

However, recently, some studies argue that plastic particles should be described using another parameter (Filella, 2015; Simon *et al.*, 2018). Here, as stated by Simon *et al.* (2018), weight was chosen as an additional parameter to record during MP studies. Indeed, plastic including MP are three dimensions particles, the description of such particles accordingly to their longest size is problematic and could not be adequate for data interpretations (Simon *et al.*, 2018). Actually, it is easy to visualize that there is an important difference in weight for a fiber measuring 500 μm in its longest size with few microns of diameters and a cubic fragment measuring 500 μm for all its side. This difference in weight could also have different adverse effect when these particles are, for example, ingested by organisms. In addition, plastic emissions to the Oceans are estimate in weight (Jambeck *et al.*, 2015) and determining MP weight could help for further estimation of MP source and quantities in the Oceans. In the present study, limit of detection of the optimized Py-GC/MS were estimated in μg because this technique is dependent on the particle weight and not their size. Moreover, in other studies using thermal analyses, MP could be directly quantified in samples as previously demonstrated (Dümichen *et al.*, 2015; Fischer et Scholz-Böttcher, 2017). Nevertheless, in the present study such quantification was not the purpose of the work. For further studies, MP weight should be estimated using weighting if possible or using volume calculation followed by weight estimation using a range of polymer density or using density found in the literature, as done by Simon *et al.* (2018).

However, before being submitted to Py-GC/MS analysis, particles have to be handled with tweezers and placed in an analysis cup. The main limitation with the presented method is the "handibility" of the particles. Below 50 μm it is very difficult to manipulate the particles as some particles may easily "fly away". Here, the device is not the limiting element whereas the operator is as almost all theoretical identifiable sizes are below 50 μm . Moreover, for application on unknown particles, the highest LOD have to be

considered to ensure accurate identification. Consequently and to date, the effective lowest size for plastic identification with this Py-GC/MS method, using particle handling, was evaluated at 50 μm .

Nevertheless, Py-GC/MS has been used to identify nanometric size scale plastic from bulk sample (Ter Halle *et al.*, 2017). This approach was made possible as it did not use direct particles handling due to their sizes and because a data statistical treatment was applied after acquisition of pyrograms (Ter Halle *et al.*, 2017). If direct handling of particles is not use, Py-GC/MS could be applied to identify smaller plastic particles. Indeed, the use of flow-cytometry using sorting (Ibrahim *et van den Engh*, 2007) could be used to place potential MP in analysis cup. Flow cytometry in combination with a camera and a cell sorter have been used to detect MP (Sgier *et al.*, 2016). Another technique could be the use of staining techniques like Nile red (Erni-Cassola *et al.*, 2017; Maes *et al.*, 2017; Shim *et al.*, 2016) before Py-GC/MS analysis. Indeed, stained particles could be introduced in analysis cup directly with the filter, for example. Moreover, the use of fixing solution to trap MP could also be a solution to isolate this particle and placing them in the analysis cup. However, potential interference of these solutions be carefully controlled before to be employed in routine. With Py-GC/MS, development to isolate particles should be performed to enhance particle handling and to ensure that the device is the only limitation.

3.3. Method comparison

Here particles were collected by hand on a local beach. Particles used to compare identifications between μ -Raman and Py-GC/MS were diverse in shapes and colors. The most common shape was fragments (21), followed by pellets (14), filaments (6), beads (5) and foams (4). Concerning particles color, green was the most common (8), followed by orange (7), blue (7), transparent (6), red (5), yellow (4), white (3), black (3), grey (3), purple (3), and pink (1).

Only forty out of fifty particles were identified with μ -Raman as plastic particles. From the ten

particles not identified, four were identified as pigments containing particles (Cobalt and copper phthalocyanine and Mortoperm blue). Among the 40 identified particles, there was: PE (22), PP (11), PS (3), PE-PP copolymer (3), and polyamide (1) (Fig 3).

The optimized Py-GC/MS method also identified all the 40 particles. Thirty seven particles (92 %) were identified as they were after μ -Raman analysis. Py-GC/MS led to results with a finer identification, two PP particles being identified as PE-PP copolymer. Moreover, the particle identified as polyamide with μ -Raman was identified as a copolymer made of PE, PP and PA-6 (see Electronic Supplementary Material Figure S13). The optimized Py-GC/MS method identified 100 % of the 40 previously identified particles with μ -Raman as plastic and demonstrated that this method is reliable for MP identification.

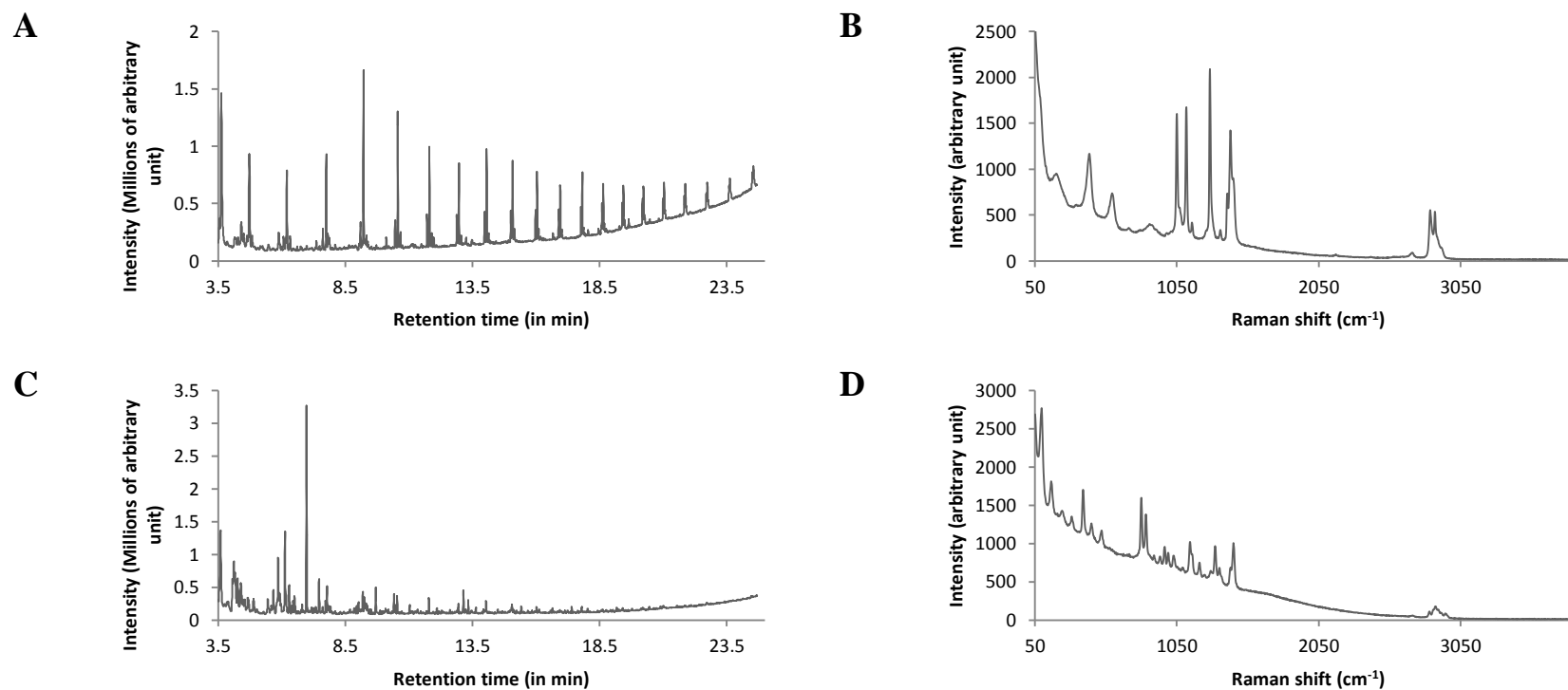


Fig. 3 Pyrograms and Raman spectra acquired at 785 nm obtained from particles collected on a beach used for method comparison. Pyrogram and Raman spectra respectively for a Polyethylene MP (A & B) and a Polypropylene MP (C & D).

Some particles were not identified with μ -Raman spectroscopy or were identified as pigments. Pigment containing particles identification were also obtained in previous studies on MP from water samples or marine organisms (Frère *et al.*, 2017; Schymanski *et al.*, 2018; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). Misidentification could occur for these pigmented particles pigments due to an overlaying of the polymer signal by the additive (Imhof *et al.*, 2016; Lenz *et al.*, 2015). Although some pigments are synthetic molecules, it could indicate a synthetic origin but those particles could not be classified as plastic with certainty leading to potential underestimation in field studies. Indeed some particle containing pigments could simply be colorful paint particles as demonstrated by Imhof *et al.* (2016). Out of the 6 not identified particles, 3 were discolored pellets. Discoloration indicates that pellets had a higher residence time in the environment (Endo *et al.*, 2005). Additionally, Py-GC/MS could also be complementary to FTIR to identified MP in field studies, as recently demonstrated (Käppler *et al.*, 2018). Indeed, using FTIR polymer signal could be overlap by some plastic additives included and identification could be disturbed (González et Fernández-Berridi, 2006; Tabb et Koenig, 1975). In a recent study, Elert *et al.* (2017) demonstrated that depending on the require information on MP information, i.e. quantification or identification of polymers, the appropriate technique should be used but the authors also indicated that identifications should be used in complementarity. Raman, FTIR and Py-GC/MS are, to date, the major identification techniques used in MP studies and those techniques are all complementary. Then, the unidentified particles with μ -Raman spectroscopy were analyzed by Py-GC/MS and included in the application section (cf. 3.4).

3.4. Application: identification of unknown particles

On the sixty analyzed particles by Py-GC/MS, twenty (16 particles from bivalves and 4 from beach samples) formerly identified as pigment

containing particles by μ -Raman were processed by Py-GC/MS. All twenty particles were fragments with blue the dominant color with only one being green. Py-GC/MS identified 14 pigment particles as plastic polymers (70 %), 4 pigment particles as plastic polymers with some uncertainty (20 %) and 2 particles were not identified (10% - Fig. 4). PS was the most common identified polymer (13 particles out of 14) with one particle identified as a copolymer of PS and PMMA. Moreover, particles identified with uncertainty displayed characteristic compounds of PS but with low intensity. Here, Py-GC/MS identified 70 % of particles that were previously identified as pigment containing particles using μ -Raman. Moreover, μ -Raman only identified presence of the pigments nature as it overlaps with polymer signals, while Pyrolysis only allow to identify the native plastic polymer. Despite an effective lowest size of 50 μ m, due to handling issue, being 10 to 50 times higher than the lowest size respectively analyzable by FTIR or μ -Raman spectroscopy, respectively, the Py-GC/MS method is still competitive and complementary. Indeed, as it allows (i) the full identification of pigments and some fibers and (ii) could be combined with improved separation methods to retrieve smaller particles. Here, Py-GC/MS could be used as a complementary identification method after μ -Raman spectroscopy.

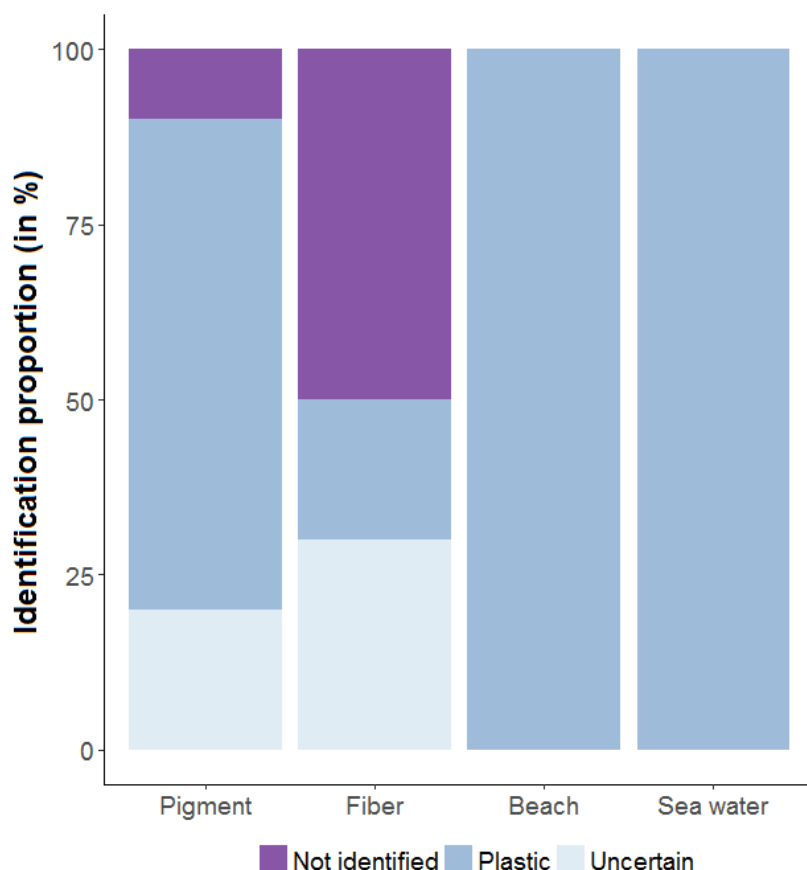


Fig. 4 Sample proportion for each identification class obtained after Py-GC/MS for particles previously identified as pigment (n=20) by μ Raman, fibers (n=10) and particles collected on a beach (n=6) and in surface sea water of the Bay of Brest (n=24). Not identified correspond to particles with low or no discernible signal, Uncertain to identification as plastic with some uncertainty and Plastic to identification with accurate polymer attribution

Out of the 10 fibers extracted from bivalves, 7 were blue, 2 were black, and 1 was red. For fibers, identification was achieved having 2 fibers identified as PE and Polyacrylonitrile (PAN). Fibers made of PAN, PE and potentially PET were identify and such polymer are commonly used in the textile industry (Napper et Thompson, 2016) and are found in wastewater treatment plants after washing machine (Browne et al., 2011). Three fibers were identified as plastic polymer with some uncertainty and 5 fibers were not identified due to low or absent signal (Fig. 5). Uncertain identification for fibers comprised 1 PE and 2 PET. Fibers identification was tough. Indeed, only 20 % of the analyzed fibers were correctly identified. As fibers are long and thin, they are lighter in comparison with fragment. As Py-GC/MS rely more on particle weight than on their size, low weight could result in uncertainty with identifications, as previously observed for fibers in a study conducted by Hendrickson et al.

(2018). To improve fibers and small particles identification, a solution could be the use of single ion monitoring (SIM) which target selected ion (m/z) allowing to decrease the LOD. Out of the 30 others particles collected at sea-surface or in beach sediment, fragments (10) were the most common particles followed by foams (6), filaments (5), pellets (4), films (4), and beads (1). Regarding particles color: white was the dominant color (8) followed by blue (6), orange (5), transparent (5), green (3), red (1), black (1), and yellow (1). Particles were all identified as plastic with no uncertainty (Fig. 5) however it is important to indicate that the particule used in this section were large MP cut (ca. 200 μ m) to be introduced in an analysis cup. PE (14) was the most common polymer followed by PP (9) and PS (4). Other polymers including PE-PP copolymer, Chlorinated PE (CPE), and Acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer (ABS) were each found only once. Py-GC/MS

provide good identification with similarity percentage above 80 %. The differentiation between PS and ABS remained difficult as both polymers are made with styrene which is the major characteristic compounds of their pyrograms (Kusch, 2016; Tsuge *et al.*, 2011). ABS reference presented an interesting characteristic compound: 1-Naphthalenecarbonitrile. This compound was only present in ABS reference pyrogram. Differentiation was made using this compound and tracking it in the pyrogram using its major ion: 153 m/z. Polymers identified i.e. PE, PP and PS are commonly reported on the beach (Lots *et al.*, 2017) and in sea-surface water (Frère *et al.*, 2017).

4. Conclusion

The present work described an in-depth optimization of a Py-GC/MS method to identify MP followed by an efficiency assessment of its performance and a comparison with Raman spectroscopic approach. In addition, to evaluate the robustness of the optimized Py-GC/MS method to identify MP, it was applied on samples from different matrices: bivalve, beach and sea-water surface. Optimization demonstrated that increasing pyrolysis temperature up to 700 °C in combination with a split ratio of 5 and an injector temperature set at 300 °C improved signal detection. Then, performance assessment demonstrated that if signal vary over time, such variation had no impact on MP identification. This method is validated on qualitative data but not on quantitative one due to RSD value above 20 % for repeatability and intermediate precision. The optimized Py-GC/MS has some advantages in comparison with other MP identification methods. Firstly, Py-GC/MS is a complementary method to spectroscopy approaches. Indeed, in the present study Py-GC/MS enable identification of pigment containing particles right after μ -Raman analysis. Moreover Py-GC/MS identified co-polymer like PE-PP or PE-PP-PA6 which could be difficult to identify with μ -Raman without chemometrics approach. Secondly, up to

date, Py-GC/MS identification of plastic particles cannot be done below 50 μ m (longest size) not because of LOD but due to operator handling issues. A better way, like the introduction of a piece of filter on which particles are into the analysis cup, should be developed in order to avoid this limiting step. However, Py-GC/MS could be used to identify smaller particles, like nanoplastics as already demonstrated. By resolving this handling issue, LOD calculation demonstrated that this method could identify isolated MP weighting below 1 μ g. In addition, another strategy that can be considered to lower the LOD for this Py-GC/MS method is the use of SIM. To get identification on MP polluting from both freshwater and marine environment, the use of Py-GC/MS should be better considered as this method prove to be efficient in identifying MP from various matrices. In an effort to standardize the MP analysis workflow, this method could be implemented either on its own or after FTIR or Raman to confirm some identification or to circumvent unsuccessful spectroscopy identification. Finally, MP mass should be evaluated in MP studies to try to standardized leading to better comparison of MP contamination between studies.

Acknowledgments

Ludovic Hermabessiere is grateful to the Hauts-de-France Region and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) for the financial support of his PhD. Maria Kazour is financially supported by a PhD fellowship from the National Council for Scientific Research (Lebanon) and Université du Littoral Côte d'Opale (France). This paper has been funded by the French National Research Agency (ANR) (ANR-15-CE34-0006-02), as part of the Nanoplastics project and also by the French government and the Hauts-de-France Region in the framework of the project CPER 2014-2020 MARCO.

Compliance with Ethical Standards

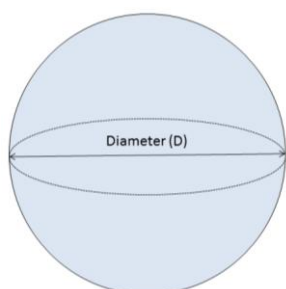
Authors declare no conflict of interest.

Supplementary files

Weight estimation

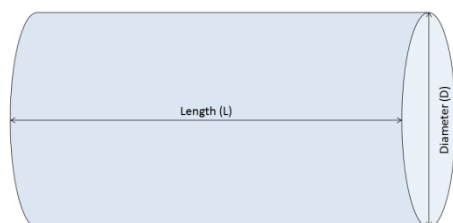
For each particle in the form of microsphere, filament or fragment the volume (cm^3) was estimated and then multiplied by the density (g/cm^3) of the polymer to obtain the estimated weight.

For microsphere, the following calculation was realized:



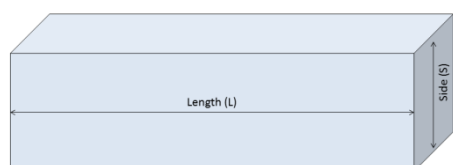
$$Volume\ microsphere = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

For filament, the following calculation was realized:



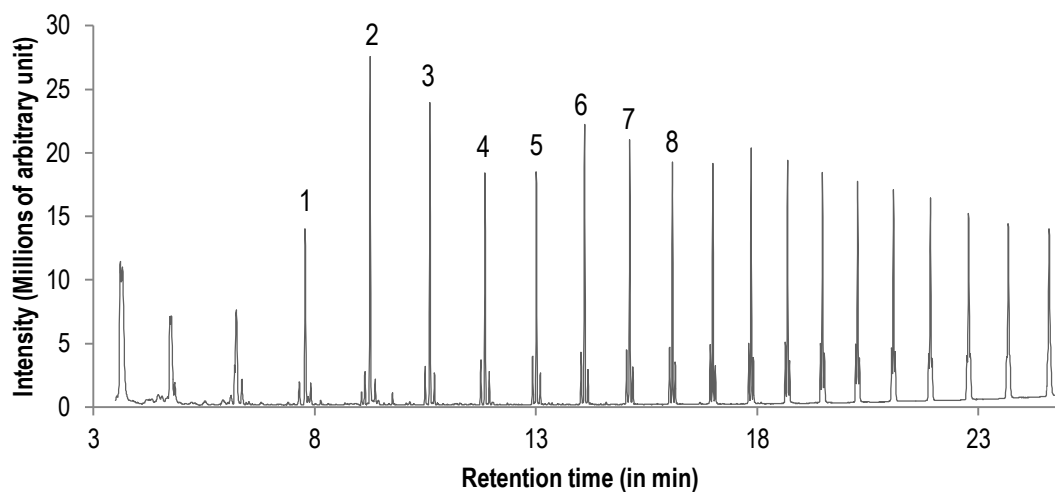
$$Volume\ filament = \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times \pi \times L$$

For fragment the following calculation was realized:



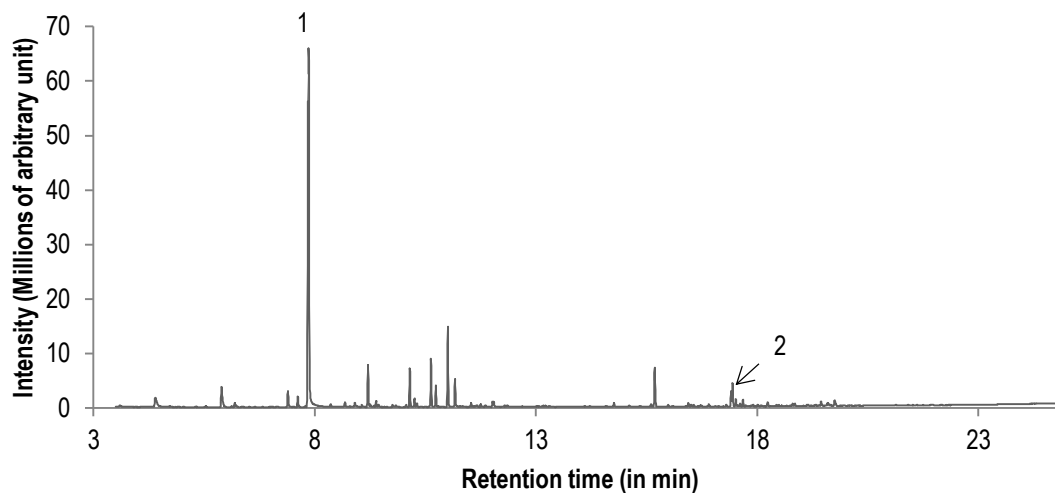
$$Volume\ fragment = S^2 \times L$$

Supplemental Figure S1: Pyrogram of PE and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



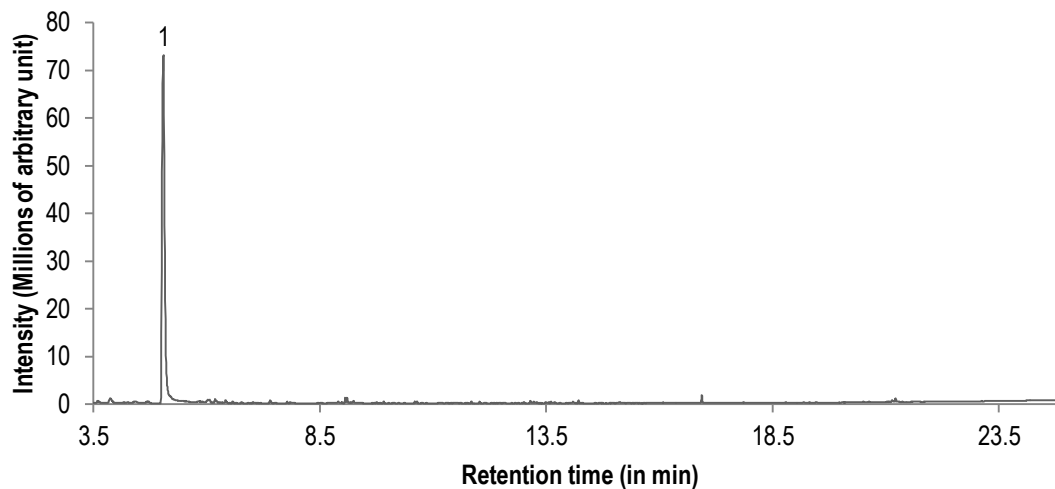
Peak number	Name
1	1-Nonene
2	1-Decene
3	1-Undecene
4	1-Dodecene
5	1-Tridecene
6	1-Tetradecene
7	1-Pentadecene
8	1-Hexadecene

Supplemental Figure S2: Pyrogram of PS and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



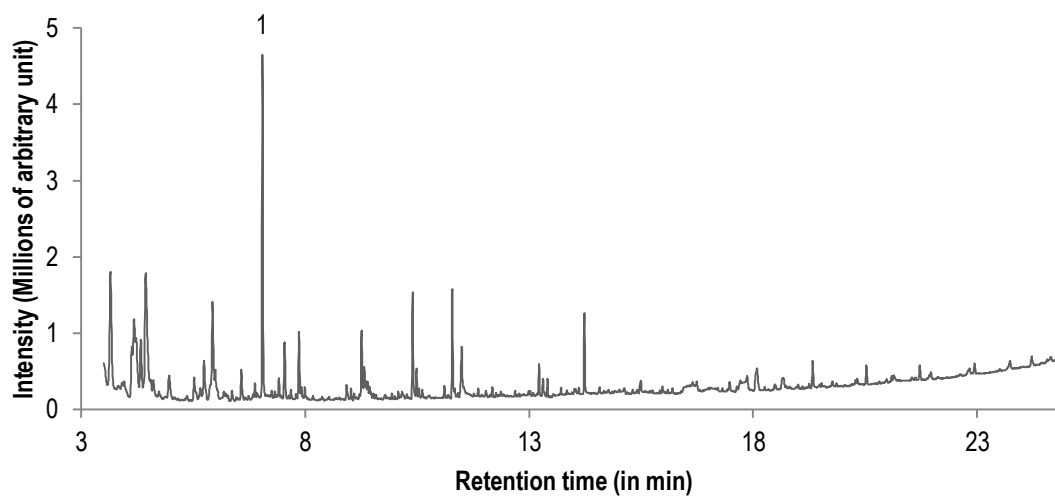
Peak number	Name
1	Styrene
2	Styrene dimer

Supplemental Figure S3: Pyrogram of PMMA and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



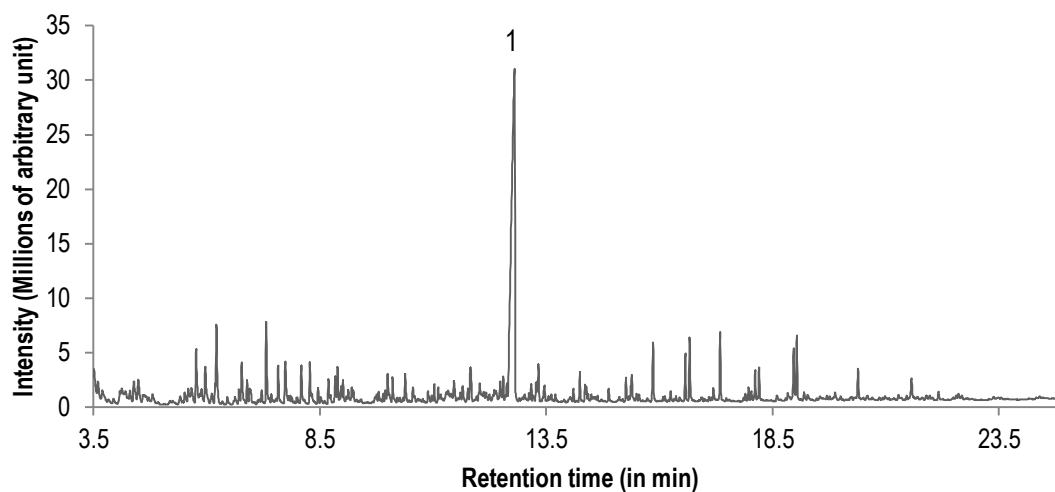
Peak number	Name
1	Methyl methacrylate

Supplemental Figure S4: Pyrogram of PP and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



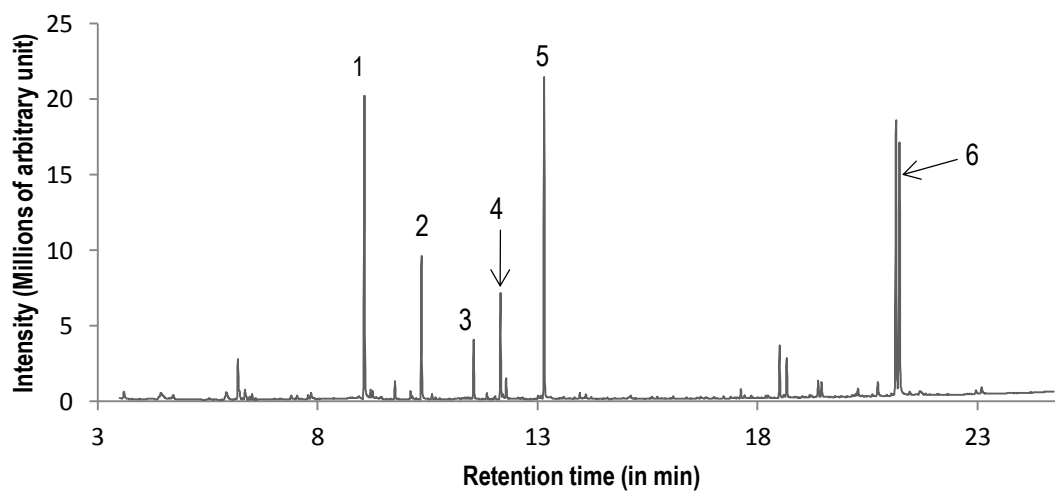
Peak number	Name
1	2,4-dimethyl-1-heptene

Supplemental Figure S5: Pyrogram of PA-6 and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



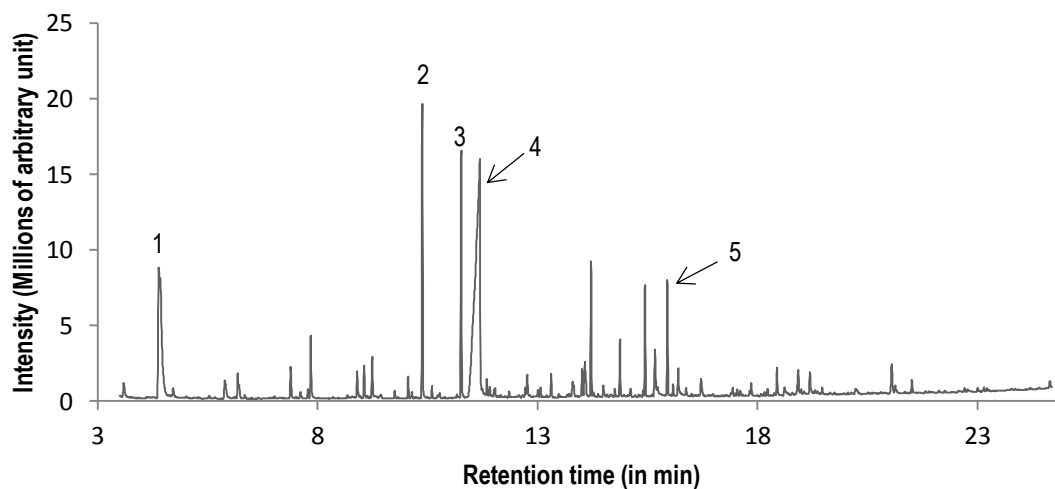
Peak number	Name
1	ε-caprolactam

Supplemental Figure S6: Pyrogram of PC and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



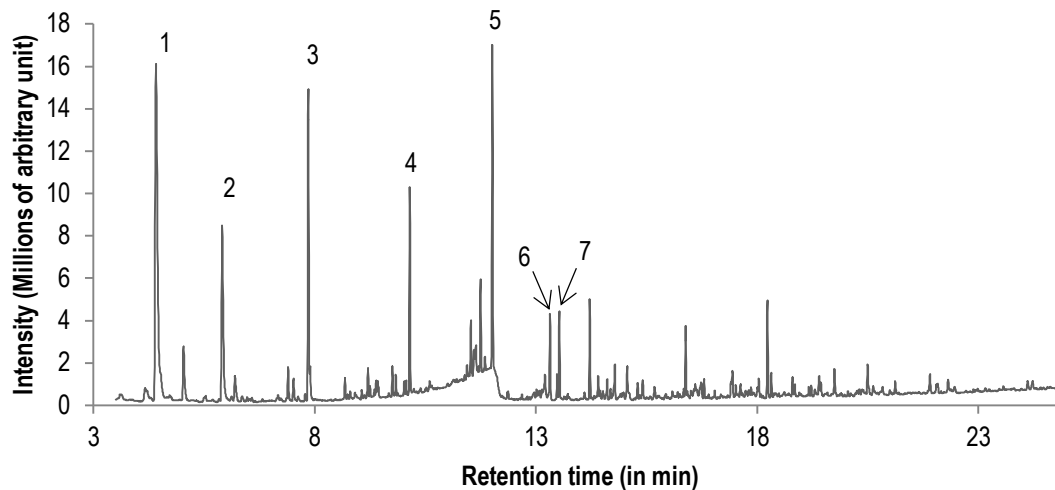
Peak number	Name
1	Phenol
2	p-Cresol
3	p-Ethylphenol
4	p-Vinylphenol
5	p-Isopropenylphenol
6	Bisphenol A

Supplemental Figure S7: Pyrogram of PET and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



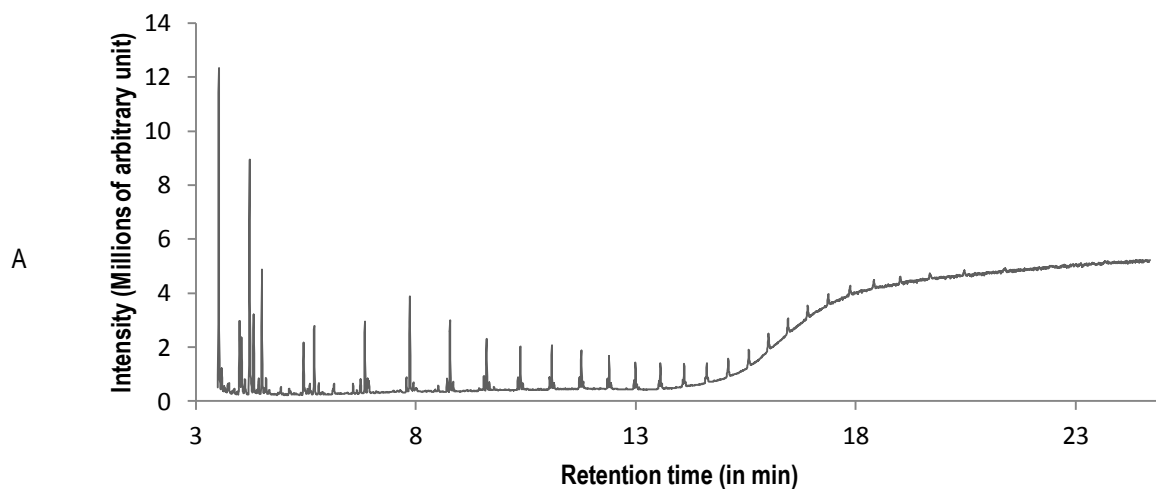
Peak number	Name
1	Benzene
2	Acetophenone
3	Vinyl benzoate
4	Benzoic acid
5	Divinyl terephthalate

Supplemental Figure S8: Pyrogram of uPVC and associate characteristics peaks after pyrolysis at 700 °C



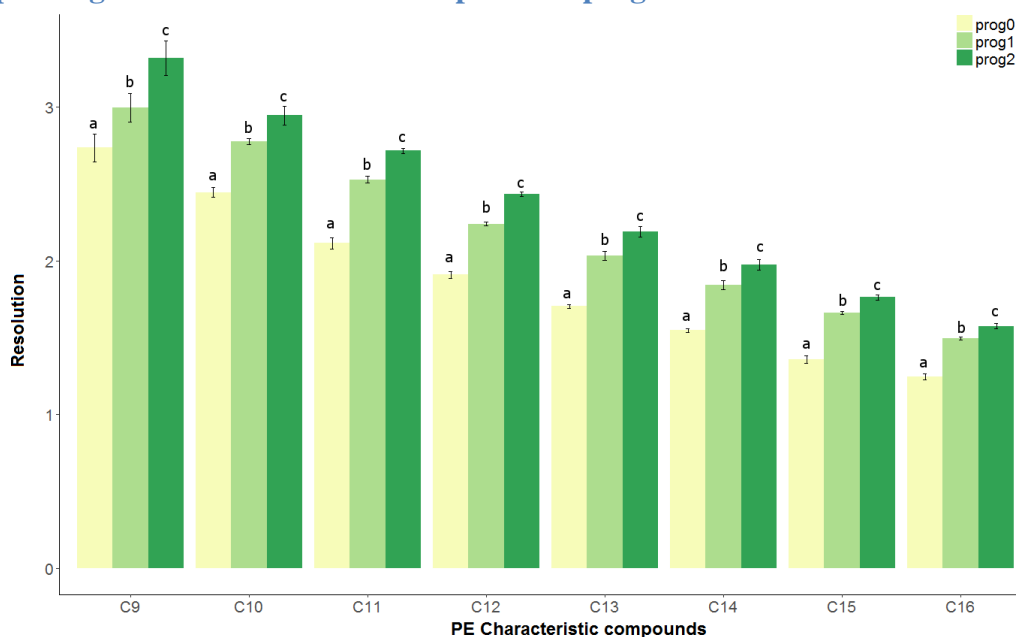
Peak number	Name
1	Benzene
2	Toluene
3	Styrene
4	Indene
5	Naphthalene
6	2-methylnaphthalene
7	1-methylnaphthalene

Supplemental Figure S9: Pyrogram obtain after the pyrolysis of PE microsphere at 800°C (A) and associate identification using F-Search 4.3 (B)



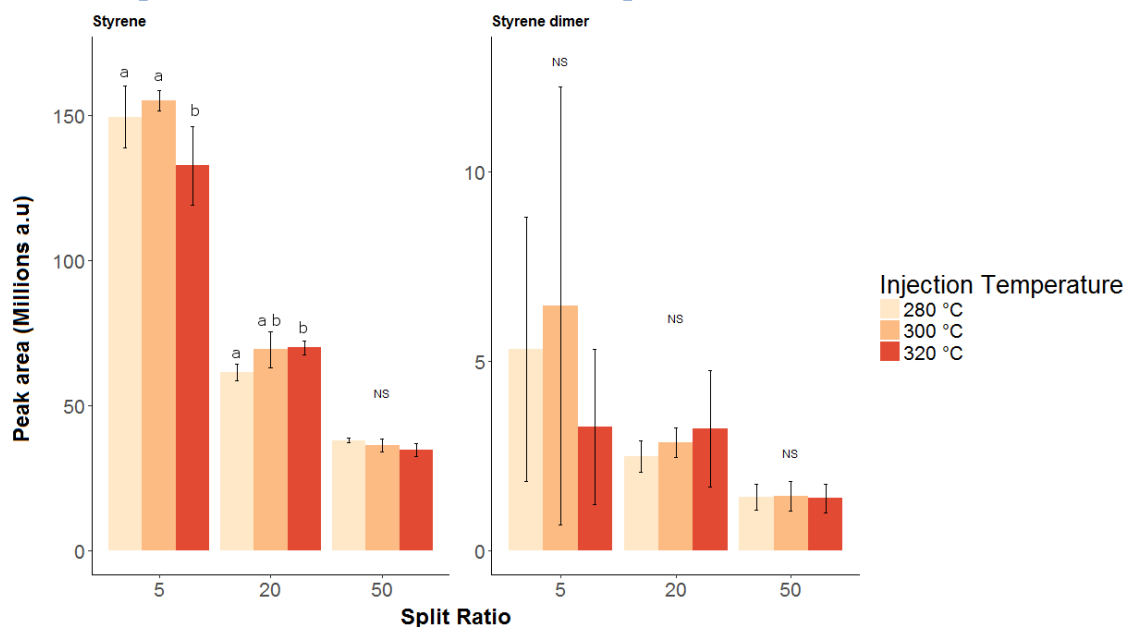
Integration times: 3.5 to 24.996 min	
Compounds name	Similarity (%)
B Polyethylene ionomer ; IO (C1-C20)	64
Polyethylene, chlorinated, 48% chlorine (C1-C10 Cl2 omitted)	64
Polyethylene, chlorinated, 48% chlorine (C1-C20 Cl2 omitted)	64
Polyethylene, chlorinated, 48% chlorine (C1-C40 Cl2 omitted)	64
Polyethylene ionomer ; IO (C1-C40)	63

Supplemental Figure S10: Resolution of Alkenes for eight characteristic compounds of PE depending on the GC used oven temperature program.



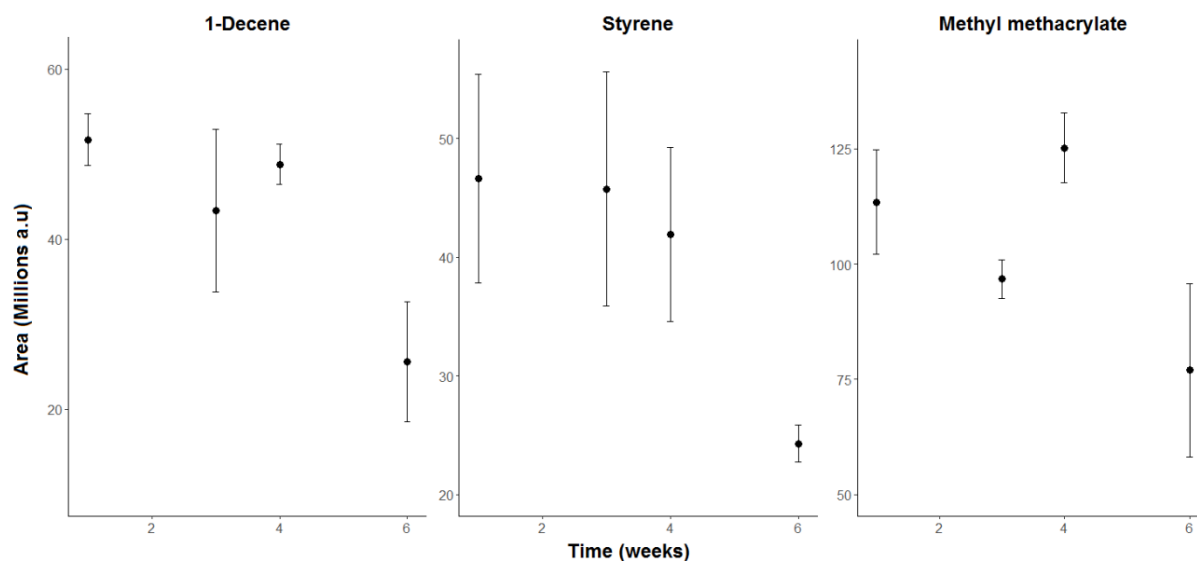
Values as expressed as mean \pm 95 % confidence interval. Letters correspond to the differences after post-hoc test using the Fisher's least significant difference with Bonferroni correction. C9: 1-Nonene; C10: 1-Decene; C11: 1-Undecene; C12: 1-Dodecene; C13: 1-Tridecene; C14: 1-Tetradecene; C15: 1-Pentadecene; C16: 1-Hexadecene.

Supplemental Figure S11: Peaks areas (Arbitrary Unit) depending on the split ratio and injection temperature for two characteristic compounds of PS.

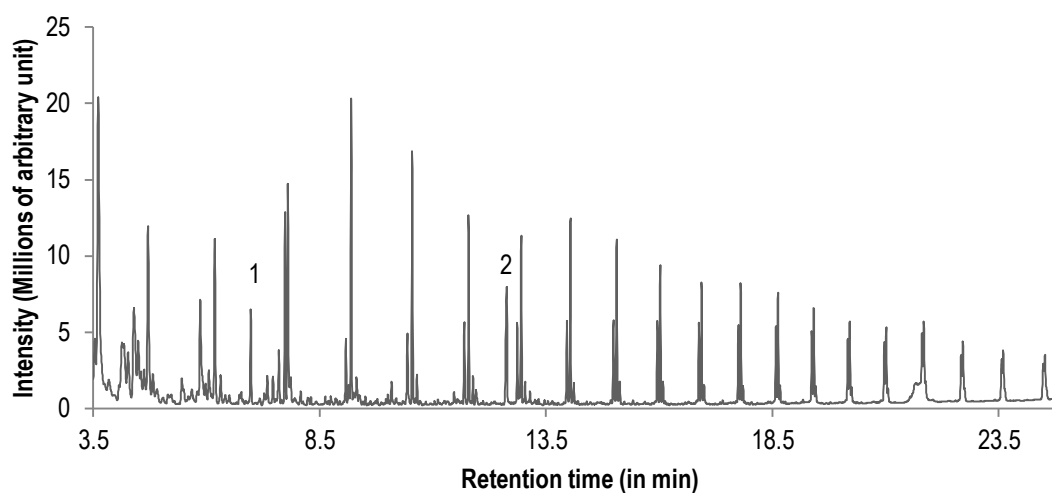


Values as expressed as mean \pm 95 % confidence interval. Letters correspond to the differences after post-hoc test using the Fisher's least significant difference with Bonferroni correction and NS stand for non-significant

Supplemental Figure S12: Mean peak areas (Millions of arbitrary unit) of characteristics compounds of PE (1-Decene), PS (Styrene) and PMMA (Methyl methacrylate) depending on the reproducibility weeks. Error bars correspond to the CI95%.



Supplemental Figure S13: Pyrogram of a PE-PP-PA6 copolymer



Peak number	Name
1	2,4-dimethyl-1-heptene
2	ϵ -caprolactam

III Discussion du chapitre 2

Les objectifs de ce chapitre étaient de développer des méthodes, qui permettent de proposer une harmonisation méthodologique, utilisable dans les études sur la contamination des produits de la pêche par les MP.

Le premier point de développement a été de sélectionner un protocole de digestion des tissus des produits de la pêche (**Article 2**). Actuellement, pour rechercher les MP dans les tissus des produits de la pêche, deux approches existent : chercher sous loupe binoculaire directement dans les tissus ou les digérer à l'aide de produits chimiques puis filtrer le digestat obtenu avant observation. Même si l'approche de recherche des MP directement dans les tissus est fréquemment utilisée par certains auteurs (Choy et Drazen, 2013; Güven *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2012; Romeo *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016; Vendel *et al.*, 2017), celle-ci n'a ici pas été sélectionnée pour ces travaux de thèse car un risque de sous-estimation de la contamination est possible car les MP peuvent être retenus par les tissus sans être détectés (Miller *et al.*, 2017). La méthode permettant de digérer les tissus des produits de la pêche, sans dégrader l'intégrité de 14 familles de plastiques sur 15, est le KOH 10% incubé à 60°C pendant 24h (**Article 2**). Depuis la publication de ces travaux (Dehaut *et al.*, 2016), plusieurs études ont confirmés que le KOH 10% était le produit chimique le plus approprié pour la digestion des tissus des produits de la pêche pour la recherche des MP (Enders *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b). Dans le même temps, des études ont développées d'autres protocoles d'extractions des MP utilisant des enzymes (Catarino *et al.*, 2017; Löder *et al.*, 2017) ou des combinaisons de produits chimiques (Budimir *et al.*, 2018). Cette multiplication du nombre de protocoles différents, juste pour la seule étape d'extraction des MP des tissus des produits de la pêche, augmente les risques de ne pas pouvoir comparer les données entre elles. De plus, chaque développement de protocole n'est pas effectué en utilisant des espèces « modèles » ce qui rend le transfert d'une équipe de recherche à une autre compliqué. Lors de la sélection du protocole KOH 10% (**Article 2**), ce protocole a été testé sur des tissus de moules, de daurades grises et de crabes verts. Néanmoins quand ce protocole a été appliqué sur des merlans, des problèmes de digestion/filtration ont été rencontrés (Section I.2). Malgré les changements d'un certain nombre de paramètres de digestion du protocole KOH 10%, aucune amélioration n'a pu être mise en évidence. Comme suggéré par Budimir *et al.* (2018), il est nécessaire de donner des limites à la méthode de digestion/filtration des TGI. Ceci a donc été entrepris pour la méthode KOH 10% (**Article 3**). Ce travail a mis en évidence, dans un premier temps, que les limites de digestion étaient de 7,5 g pour les soles et les maquereaux et de 15 g pour les

daurades grises, les bars et les merlans Dans un second temps, une forte variabilité de la faisabilité de digestion/filtration, même pour une même espèce et une même classe de masse de TGI considérée a été mise en évidence. Les TGI des merlans sont digérables puis filtrables jusqu'à une masse de 15 g alors que cela n'était pas possible lors de manipulations similaires effectuées précédemment avec des TGI de masse équivalente. Il est toutefois important de noter que les ratios de KOH/g de TGI utilisés et les périodes de pêche entre les deux études n'étaient pas les mêmes. Les merlans utilisés pour l'article 3 ont été pêchés entre septembre et décembre alors que les autres ont été pêchés entre janvier et mai soit pendant la période de ponte (Ifremer, 2011). Une explication possible est que les poissons n'ont pas été pêchés à la même période de l'année. La période de ponte a pu avoir un impact sur la composition des tissus des animaux. Durant la période de ponte, la proportion de lipides dans la composition des filets est au plus bas et la prise alimentaire diminue (Huss, 1995). Néanmoins, il semble que la limite de masse pour la digestion/filtration des TGI avec du KOH 10% soit liée à plusieurs paramètres qui peuvent varier en fonction de la maturité de l'animal. Une harmonisation des espèces à étudier et de la période d'étude devrait être prise en considération par les institutions afin de faciliter les possibles comparaisons inter-études.

Le second point de développement a été d'optimiser, d'évaluer les performances et d'appliquer une méthode de Py-GC/MS sur des MP provenant de différentes matrices (**Article 4**). La Py-GC/MS, avec la spectroscopie FTIR et Raman, est une technique couramment utilisée pour identifier les polymères plastiques à des tailles microscopiques (Ceccarini *et al.*, 2018; Dekiff *et al.*, 2014; Fries *et al.*, 2013; Hendrickson *et al.*, 2018; Nuelle *et al.*, 2014) ou nanoscopique (Ter Halle *et al.*, 2017). La Py-GC/MS est complémentaire des approches spectroscopiques car elle permet notamment l'identification des fibres et des pigments alors que la spectroscopie Raman et le FTIR présentent des difficultés à identifier les particules pigmentées. De plus, la Py-GC/MS permet d'identifier des particules très petites, de taille nanométriques, comme démontré par Ter Halle *et al.* (2017) et Mintenig *et al.* (2018). La méthode optimisée de Py-GC/MS peut détecter des particules jusqu'à une masse de 1 µg et une taille limite de 50 µm. Cette taille limite n'est pas due à l'instrumentation mais à l'opérateur car actuellement les particules sont introduites manuellement dans les cupules d'analyses. Afin d'harmoniser aussi les méthodes d'identification des MP, un workflow analytique pourrait être proposé afin d'utiliser les caractères complémentaires des différentes méthodes. Ceci a récemment été proposé par Mintenig *et al.* (2018) avec l'utilisation de la spectroscopie µ-FTIR pour analyser les MP et la Py-GC/MS pour analyser les nanoplastiques. De plus, comme réalisé dans l'article 4, une autre mesure permettant de mieux quantifier les

MP devrait être ajoutée à celle permettant de les décrire (la taille actuellement). En effet, comme suggéré récemment par [Simon *et al.* \(2018\)](#) et [Mintenig *et al.* \(2018\)](#), la masse des MP devrait être consigné, que ce soit par pesée des particules ou par estimations à l'aide de calculs, afin de pouvoir mieux comparer les études entre elles.

Chapitre 3 Microplastiques dans les produits de la pêche



Préambule

La pollution globale des environnements marins par les MP a pour conséquence l'ingestion de ces particules par un grand nombre d'espèce. L'ingestion de plastiques de toutes tailles concerne une multitude d'espèces allant des grands mammifères marins jusqu'aux organismes de très petite taille comme le zooplancton en passant par des organismes comme les poissons ou les tortues (Cole *et al.*, 2013; Gall et Thompson, 2015).

Depuis plusieurs années, la littérature concernant la contamination des poissons et des bivalves de tous les continents par les MP est en constante augmentation. Néanmoins, à ce jour, peu de travaux ont considéré les poissons et les bivalves comme des produits de la pêche pouvant être consommés par l'Homme. En effet, de manière générale, les études se cantonnent à l'aspect écologique, c'est à dire l'effet du mode de vie et d'alimentation, effet de la position dans la colonne d'eau etc. Par exemple, les études sur les poissons ne prennent en compte que le tractus gastro-intestinal comme organe pouvant être contaminé sans étudier les filets qui sont, eux, consommés par l'Homme.

Dans ce contexte, les objectifs de ce chapitre ont été de déterminer la contamination en MP et en polluants chimiques associés à des produits de la pêche consommés par l'Homme. Dans ce chapitre ont été considérés d'une part les produits de la pêche consommés par l'Homme, c'est à dire les bivalves entiers ainsi que les filets de poissons, et d'une autre part les tractus gastro-intestinaux (TGI) des poissons.

I Contamination de deux espèces de bivalves le long des côtes de la Manche

I.1 Introduction

Cette partie sur la contamination aux MP et aux polluants associés chez deux espèces de bivalves échantillonnées le long des côtes de la Manche est en préparation pour soumission au journal *Marine Pollution Bulletin* (**Article 5**) :

Hermabessiere L., Cassone A.L., Himber C., Receveur J., Jezequel R., Rinnert E., El Rakwe M., Rivière G., Lambert C., Huvet A., Dehaut A., Paul-Pont I., Duflos G. & Soudant P., in prep. Microplastic contamination and associate pollutant in mussels and cockles along the French English Channel coasts. *Marine Pollution Bulletin*.

Les objectifs de ce travail étaient de (i) quantifier la concentration en MP dans deux espèces de bivalves couramment consommées en France : la moule (*Mytilus edulis*) et la coque (*Cerastoderma edule*), (ii) de quantifier certains additifs plastiques et polluants organiques hydrophobes (HOC) dans les tissus de ces bivalves et (iii) d'étudier la relation possible entre la contamination en MP et les concentrations de HOC et d'additifs plastiques. En effet, certains produits chimiques peuvent être des indicateurs de la consommation de plastiques et cette possible relation a donc été explorée.

Pour répondre à ces objectifs, des moules et des coques ont été échantillonnées sur plusieurs sites le long des côtes de la Manche. Pour les sites du Pas-de-Calais, 50 moules ont été prélevées à Le Portel (LP), commune à proximité de Boulogne sur mer, et 50 coques ont été échantillonnées en Baie d'Authie (BA), respectivement en octobre et novembre 2015. Pour la Normandie, 50 coques et 50 moules ont été échantillonnées en Baie des Veys (BdV) en novembre 2015. Les individus ont été mesurés, pesés puis digérés en utilisant la méthode au KOH 10% développée dans l'article 2 (Dehaut *et al.*, 2016). Après filtration puis sélection sous loupe binoculaire, les particules ressemblantes à des MP (MP-like) ont été identifiées par spectroscopie μ -Raman. En parallèle, les digestats des bivalves ont été récupérés puis regroupés afin d'extraire les HOC (PCB, HAP et pesticides organochlorés) et les additifs plastiques (PBDE et phtalates) présents dans les individus. Les polluants ont été extraits par sorption sur barreau magnétique (SBSE) puis dosés par thermo-désorption couplée à une chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem (TD-GC-MS-MS).

I.2 Synthèse des principaux résultats de l'article 5

Dans les 200 individus, 1312 particules ressemblantes à des MP ont été isolées puis analysées par spectroscopie μ -Raman. Après identification, 40% en moyenne de ces particules n'étaient pas identifiées à cause de signal trop faible ou à cause de fluorescence importante. Les 60% restants ont été identifiés comme des particules d'origines naturelles, des pigments ou comme des MP. Les polymères plastiques identifiés étaient les suivants : le PE, le PP, le PS, le PET, l'ABS et le poly(styrène/butadiène) (SBR). La composition en polymère ingérée par les bivalves est dépendante du site d'échantillonnage avec un enrichissement en ABS pour les moules échantillonnées à Le Portel, en SBR pour les coques de la Baie d'Authie et en PP pour les coques de la Baie des Veys. La proportion d'individu contaminé par des MP était comprise entre 34 et 58% avec entre $0,25 \pm 0,16$ MP/g de chair et $0,74 \pm 0,35$ MP/g de chair quelque soit l'espèce ou le site considéré. La contamination des coques et des moules des côtes de la Manche était du même ordre de grandeur que la contamination d'autres espèces de bivalves des côtes européennes. La taille des MP, contaminant les bivalves, était dans 66% des cas inférieurs à 100 μm . En ajoutant les fibres et les pigments aux MP, comme conventionnellement réalisé dans d'autres études, la contamination des bivalves a augmenté. La proportion d'individu contaminé était de 68 à 86% et la contamination était, en considérant toutes les particules, comprise entre $0,59 \pm 0,12$ particules/g de chair et $0,98 \pm 0,27$ particules/g de chair quelque soit le site d'échantillonnage. Pour les additifs plastiques et les HOC, ceux-ci n'ont pu être analysés que sur un nombre restreint de regroupements de digestats de bivalves suite à des problèmes méthodologiques. Néanmoins, divers polluants ont été détectés dans les échantillons à l'exception des HAP et des PCB dans les coques échantillonnées en baie d'Authie et des pesticides organochlorés et des PCB dans les coques échantillonnées en Baie des Veys. Aucun lien entre la concentration en MP et la concentration des HOC ou des additifs plastiques n'a été montré pour les bivalves échantillonnés le long des côtes de la Manche (Figure 19).

Analyse des microplastiques et des polluants associés dans des bivalves des côtes de la Manche

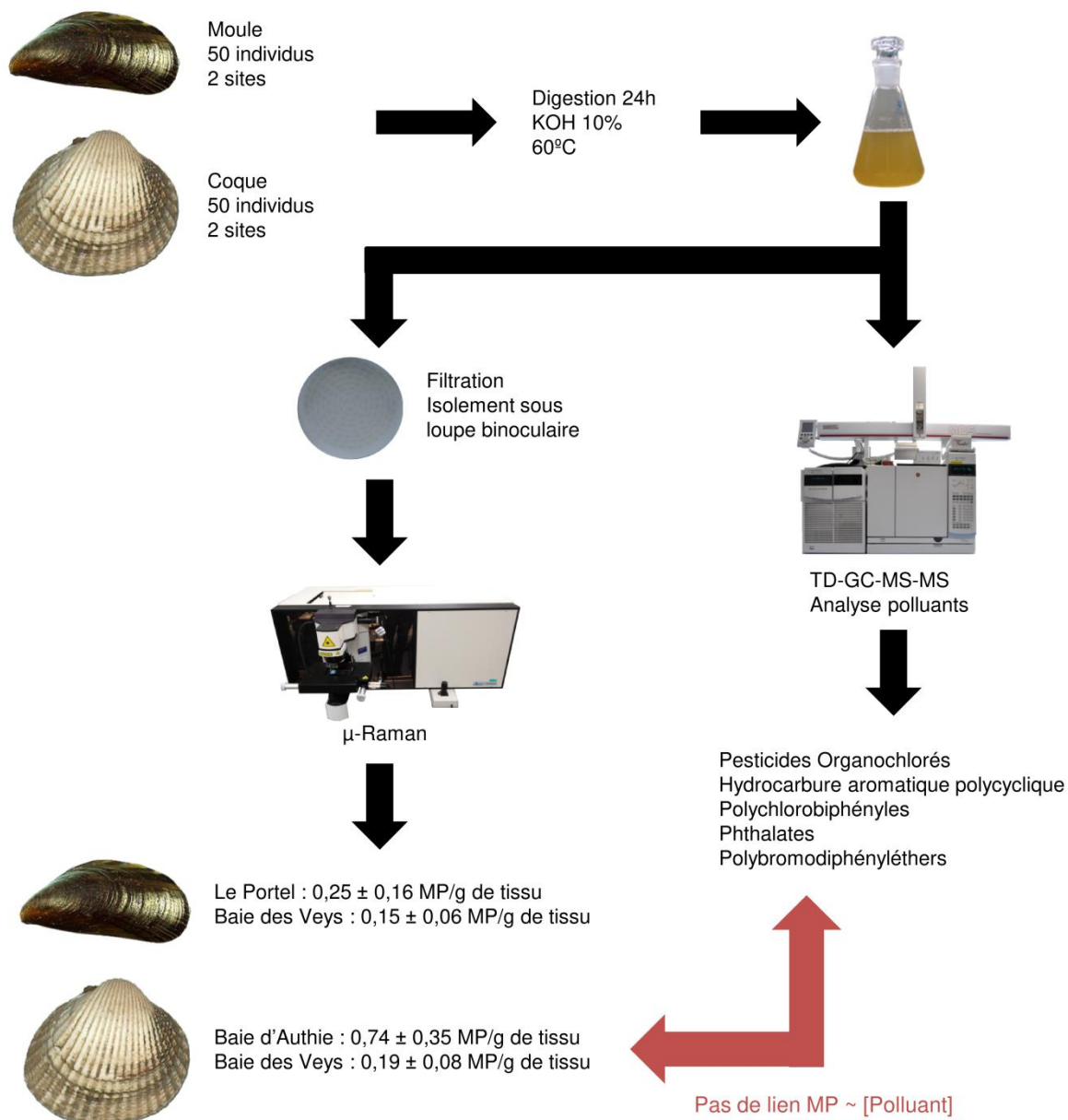


Figure 19 : Démarche expérimentale pour l'analyse de microplastiques et des polluants associés chez deux espèces de bivalves, la moule et la coque, échantillonnées le long des côtes de la Manche.

I.3 Article 5 : Microplastic contamination and associate pollutant in mussels and cockles along the French English Channel coasts

Microplastic contamination and associate pollutant in mussels and cockles along the French English Channel coasts

HERMABESSIERE Ludovic ^a, CASSONE Anne-Laure ^b, HIMBER Charlotte ^a, RECEVEUR Justine ^c, JEZEQUEL Ronan ^c, RINNERT EMMANUEL ^d, EL RAKWE Maria ^d, RIVIÈRE Gilles ^e, LAMBERT Christophe ^b, HUVET Arnaud ^f, DEHAUT Alexandre ^a, PAUL-PONT Ika ^b, DUFLOS Guillaume ^a, SOUDANT Philippe ^{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 CEDRE, 715 Rue Alain Colas, 29218 Brest Cedex 2, France.

^d IFREMER, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM), Centre Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

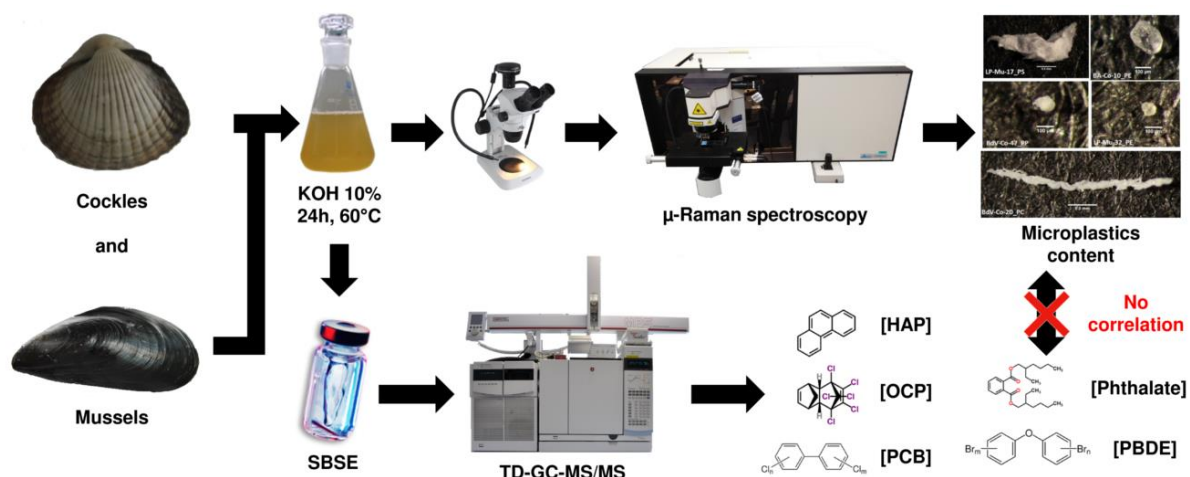
^e ANSES, Direction d'Evaluation des Risques, 14 Rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex, France

^f IFREMER, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539/UBO/CNRS/IRD/IFREMER, 29280 Plouzané, France

* Corresponding author:

Philippe.soudant@univ-brest.fr

Graphical abstract



Abstract

Pollution of the environment by microplastics (< 5mm; MP) is a major issue nowadays with MP contaminating marine organisms consumed by humans. The present work studied MP contamination in two bivalve species of commercial interest: blue mussel (*Mytilus edulis*) and common cockle (*Cerastoderma edule*) sampled on the French English Channel coasts. In parallel, plastic additives and hydrophobic organic compounds (HOC) were quantified in bivalves flesh using SBSE-TD-GS-MS/MS to explore the possible relationship between their concentrations and MP contamination levels. MP were extracted using a 10% potassium hydroxide digestion method then identified by μ -Raman spectroscopy. The MP occurrence ranged from 34 to 58%. Blue mussels and common cockles exhibited between 0.25 ± 0.16 to 0.74 ± 0.35 MP/g of tissue wet weight. Moreover, HOC and plastic additives were detected in bivalves but no correlation was established between MP load and plastic additive or HOC concentrations in the two species.

Keywords

Microplastic, mussel, cockle, contamination, plastic additive

1. Introduction

Nowadays, plastic is a commonly used material with numerous benefits for human everyday life (Thompson *et al.*, 2009). To meet the growing demand, plastic production increased exponentially since the 1950's from only 2 million metric tons produced in 1950 to 381 million metric tons in 2015 (Geyer *et al.*, 2017). Simultaneously, plastics tend to accumulate in natural environments due to their durability and resistance (Barnes, 2002; Horton *et al.*, 2017).

Small plastic particles, called microplastics (MP; <5 mm) (Arthur *et al.*, 2009) are ubiquitous in the marine environment (Li *et al.*, 2016c) and are found in beach sediment (Claessens *et al.*, 2011; Dekiff *et al.*, 2014), in the water column (Collignon *et al.*, 2012; Desforges *et al.*, 2014; Lattin *et al.*, 2004), in deep-sea sediment (Fischer *et al.*, 2015; Woodall *et al.*, 2014) and even in sea and ice samples from a remote area: the Arctic (Lusher *et al.*, 2015a; Peeken *et al.*, 2018). Coastal environments are also subjected to MP pollution. Indeed, as these environments are interfaces between lands and seas, pollution can either originate from terrestrial or marine origins. Terrestrial activities are responsible for 80% of plastic load in the Oceans (Andrady, 2011). Several studies found MP in coastal environments (Li *et al.*, 2016c; Naidoo *et al.*, 2015; Nel et Froneman, 2015; Ng et Obbard, 2006) with highest levels up to 16,272 MP/m³ in coastal waters around Geoje Island, South Korea (Song *et al.*, 2014) and up to 8,720 MP/kg (dry weight) of beach sediment in Wanning, China (Qiu *et al.*, 2015).

Numerous marine species are known to ingest MP (Lusher, 2015) including coastal species harvested or cultivated for human consumption. Due to their commercial interest and the fact that the whole animal is eat by consumers, contaminations of bivalves are a major subject of concern. Their feeding mode directly exposed bivalves to pollutants as MP present in their surrounding environment. Consequently bivalves, especially mussels (*Mytilus* spp.), are commonly used as a sentinel organism to monitor anthropogenic pollution in marine coastal

environment (Goldberg, 1975). Indeed, ingestion of MP has been demonstrated *in situ* in numerous bivalves species including mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*), oysters (*Crassostrea gigas*) or clams (*Venerupis philippinarum*) (Davidson et Dudas, 2016; Phuong *et al.*, 2018a; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Vandermeersch *et al.*, 2015a). For example Van Cauwenberghe et Janssen (2014) reported up to 0.36 MP/g of tissue wet weight (ww) in mussels collected on German coasts whereas Phuong *et al.* (2018a) reported 0.23 MP/g of tissue ww in mussels sampled on French Atlantic coast. In laboratory experiments, uptake of MP resulted in different side effects on bivalves physiology (Browne *et al.*, 2008; Cole et Galloway, 2015; Paul-Pont *et al.*, 2016; Sussarellu *et al.*, 2016; von Moos *et al.*, 2012; Wegner *et al.*, 2012). For example, oysters (*C. gigas*) exposed to polystyrene microspheres modified their feeding capacity and affected reproductive outputs (Sussarellu *et al.*, 2016). Apart from the physical injuries caused by MP, their ingestion could also be associated with the release of hydrophobic organic compounds (HOC) or plastic additives (Hermabessiere *et al.*, 2017). Some studies proposed the use of several chemicals as proxies of plastic ingestion including polychlorinated biphenyls (PCB) (Teuten *et al.*, 2009), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014) or polybrominated diphenyl ethers (PBDE) (Tanaka *et al.*, 2013).

In the present study, two bivalve species, the blue mussel (*M. edulis*) and the common cockle (*Cerastoderma edule*) were chosen to study MP contamination because these species live in different habitat and are both commonly found on French coasts. Cockles are dwelling sediment organism living at the interface between sediment and water whereas mussels are living in the water column on rocks or on lines and bouchot in aquaculture. In addition, both species are commercially important seafood products. France is one of the top producers of mussels (*Mytilus* spp.) in Europe with 47,394 tons produced in 2016 (FAO, 2018b) and 1,890 tons of cockle were produced in France in 2016 (FAO, 2018b).

Globally, in Europe, mussels (*Mytilus* spp.) are one of the most consumed seafood products (European Commission, 2017).

The aims of this work were (i) to quantify MP content in two common commercial bivalves species, the blue mussel and the common cockle, sampled along the French English Channel coast, (ii) to quantify HOC and plastic additives in the bivalves tissues and (iii) to explore relationships between MP load in bivalves and HOC and plastic additive tissue concentrations.

2. Material and methods

2.1. Sampling

All sampling sites were located on the English Channel coasts (Fig. 1) which exhibit the most important tide system in Europe associated with strong current (Salomon et Breton, 1993). The Baie d'Authie (BA) is a small estuary influence by the river Authie which have a mean flow of 9 m³/s mainly influenced by agricultural activities (Billon et al., 2001; Gillet et al., 2008). The Baie des Veys (BdV) is an estuarine bay under the influence of two rivers: the Taute and the Vire with a total mean discharge of 53 m³/s. The intertidal part of the bay support intensive oyster farming with around 10,500 tons (Grangeré et al.,

2009). Moreover, this bay could also be influenced by the Seine flow depending on meteorological conditions (Ellien et al., 2004). Finally, Le Portel (LP) beach is not influenced by any river but is located in an area with a total population of 116,000 inhabitants in 2014 (INSEE, 2015a). Overall, BdV and BA are small estuaries with small influence of human activities whereas LP is located in a relative high populated area.

Mussels (n=50) were collected at LP (50°42'30.02"N, 1°33'34.43"E) on Oct 29th, 2015. Mussels (n=50) and cockles (n=50) were then sampled at the BdV (49°22'23.4"N, 1°06'40.0"W) on Nov 1st, 2015. Finally, cockles (n=50) were sampled at the BA (50°22'17.22"N, 1°35'4.8"E) on Nov 15th, 2015. In total, 100 mussels and 100 cockles were collected. After field sampling, shell was cleaned with filtered distilled water and length was measured for all individuals. Then bivalves were shelled and their soft tissue wet weights (ww) were recorded. Samples were wrapped in a piece of paper then in aluminum foil and stored at -20°C before subsequent analysis. Procedural blank was performed during opening and weighting (see 2.2.1).

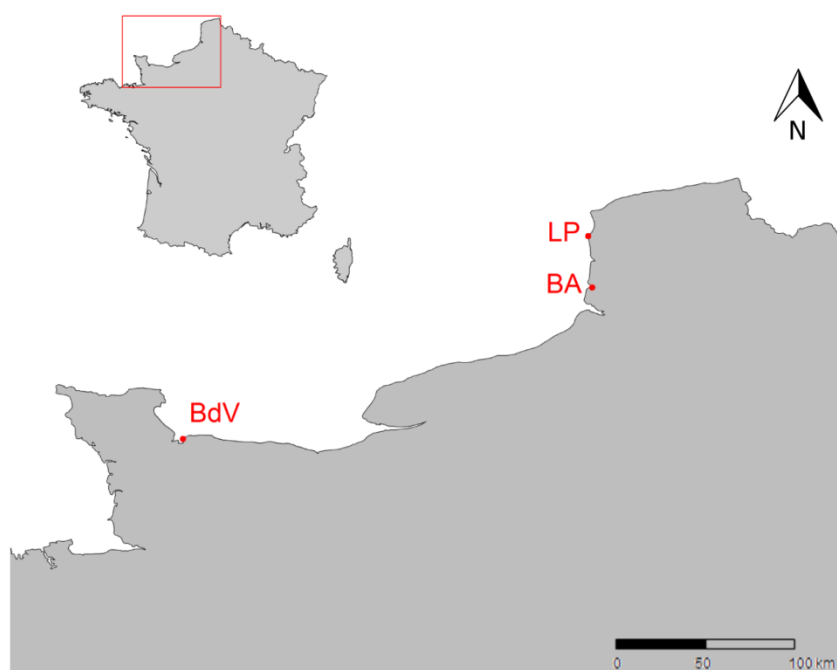


Fig. 1. Mussels and cockles sampling locations across the French English Channel coast. BA: Baie d'Authie, BdV: Baie des Veys and LP: Le Portel.

2.2. Microplastics analyses

2.2.1. Prevention of procedural contamination

To avoid overestimation of the MP concentration in bivalves due to airborne, container, and tool contamination, preventative measures were applied. All used materials were made of glass. All the solutions, distilled water, 70% (v/v) ethanol, 10% potassium hydroxide (KOH) were filtered through a 90 mm diameter GF/A 1.6 µm glass fiber filters (Whatman, Velizy-Villacoublay, France) until no particle was found on the filter. Moreover, all glassware, tools and lab surface were rinsed three times with filtered distilled water and filtered 70% ethanol before being used. Glass fiber filters were verified under a stereomicroscope to ensure that no particles were present before being used.

Procedural blanks were performed at every step of the work: dissection, digestion and filtration and consist in glass Petri dish open during the procedures. Furthermore, a procedural blank made of only 10% KOH followed the same treatment as the bivalve samples. Digestion and filtration were performed in fume hood specifically dedicated to MP analyses, with a switched-off aspiration system, to prevent contamination with airborne particles from the ambient air. Finally, operators did not wear gloves and synthetic clothing to limit no contamination due to fixed airborne particles and they wore lab coat made of cotton.

Fibers could not be identified using µ-Raman spectroscopy and were only counted. In addition, in order to account for airborne contamination, whenever a fiber was found in a procedural blank, it was subtracted from the final result if a fiber of the same type (*i.e.* color and shape) was found in the sample.

2.2.2. Tissue digestion and filtration

Digestion of mussels and cockles were performed according to [Dehaut *et al.* \(2016\)](#). After thawing, individuals were placed in 300 mL Erlenmeyer flasks then 10% KOH was added. For bivalves from LP and BA, 100-250 mL of 10% (w/w) KOH were added (ChimiePlus, Saint Paul de

Varax, France) and then samples were placed 24 h in an incubator (Binder BD 240, Tuttlingen, Germany) set at $60 \pm 1^\circ\text{C}$ with agitation set at 200-300 rpm (IKA KS250, Staufen, Germany or 2mag MIXDrive 6 HT, Munich, Germany). For bivalves sampled at BdV, a solution of 10% KOH (w/v) was prepared using pellet (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and distilled water. Bivalves were put in 250 mL of prepared 10% KOH then placed on an agitation plate (IKA RT15, Staufen, Germany) set at 300 rpm and $60 \pm 1^\circ\text{C}$ during 24 h. After digestion, all samples were filtered on a clean 90 mm diameter GF/A 1.6 µm glass fiber filters (Whatman, Velizy-Villacoublay, France) using a vacuum system. Filters were then placed in Petri dish closed until subsequent analysis. Procedural blank was performed as the same time manipulating mussel and cockle soft tissue (see 2.2.1).

Except for mussels from LP due to handling issue, two pools of 100 mL, by species and location, of bivalve digestates obtained with 10 mL belonging to 10 different individuals were prepared and conserved at -20°C until further analyses of HOC and plastic additives.

2.2.3. Visual sorting and µ-Raman analysis

Filters were observed under a Zeiss Stemi 508 stereomicroscope (Zeiss, Marly le Roi, France). Particles resembling MP (MP-like) were counted and characterized according to their shape (fragment, fiber, bead, foam or pellet) and color ([Lusher *et al.*, 2017a](#)). MP-like were then isolated for subsequent µ-Raman spectroscopy analysis. Pictures of MP-like were taken and sizes were measured in pixel using GIMP 2 software (2.8.16). The maximum length in µm of MP-like particles was calculated using a scale bar. Particles were categorized depending on their maximum size according to the following class sizes: <50, 50-100, 100-500 and >500 µm.

µ-Raman analyses were conducted according to [Frère *et al.* \(2016\)](#). Briefly, MP-like were analyzed with a LabRam HR800 (HORIBA Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) using laser wavelength set at 785 nm (Laser diode, Oxixus, Lannion, France) or 514 nm (Ar Laser, Melles

Griot, Bensheim, Germany). A laser wavelength of 785 nm was used in first attempt and if identification was not conclusive, acquisition with laser wavelength set at 514 nm was carried out. Experimental conditions for μ -Raman analyses - integration time, accumulation, laser power and wavelength - were set to limit fluorescence and increase the spectral quality of the analyzed particles. Particles identifications were performed by comparing acquired spectra to references spectra to home-made database including the following reference polymers: Polyethylene Low Density (PELD), Polyethylene High Density (PEHD), Polypropylene (PP), Polystyrene (PS), Unplasticized Polyvinyl Chloride (uPVC), Polyethylene Terephthalate (PET), Polyamide-6 (PA-6), Polyamide-12 (PA-12), Polytetrafluoroethylene (PTFE), Polymethylmethacrylate (PMMA), Acrylonitrile-Butadiene-Styrene (ABS), Polyurethane (PUR)

acquired from GoodFellow (Lille, France). Spectra with no identification in home-made database were compared to spectra described by [Socrates \(2004\)](#).

Contamination results were expressed as percentage of contaminated individuals, mean particles/individuals and mean particles/g of tissue ww. Results were given for contamination by MP, fiber, pigmented particles and all categories (MP+fiber+pigment).

2.3. Hydrophobic organic compounds and plastic additive analyses

2.3.1. Target chemicals

Five groups of chemicals were analyzed including 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), 6 polychlorinated biphenyls (PCB), 6 organochloride pesticides (OCP), 6 phthalates and 7 PBDE (Table 1).

Table 1. Chemicals analyzed from the bivalves digestates: cockles from Baie d’Authie (BA); cockles and mussels from Baie des Veys (BdV).

Chemical family	Target chemical or congener	PubChem ID
PAH	Naphtalene	931
	Benzothiophene	7221
	Biphenyl	7095
	Acenaphtylene	9161
	Acenaphtene	6734
	Fluorene	6853
	Dibenzothiophene	3023
	Benzo(g,h,i)perylene	9117
	Phenanthrene	995
	Anthracene	8418
	Fluoranthene	9154
	Pyrene	31423
	Benzo(a)anthracene	5954
Chrysene	9171	
Benzo(b+k)fluoranthene	9158	
PCB	PCB-7	36399
	PCB-28	23448
	PCB-52	37248
	PCB-105	36188
	PCB-156	38019
	PCB-169	23448
OCP	Hexachlorobenzene	8370
	Aldrin	101611446
	Isodrin	10066
	Dieldrin	3048
	2,4-DDE ^a	246598

	Endrin	12358480
PBDE	BDE-28	154083
	BDE-47	95170
	BDE-99	36159
	BDE-100	154083
	BDE-153	155166
	BDE-154	15509898
	BDE-183	15509899
Phthalate	BBP ^b	2347
	DEHP ^c	8343
	DEP ^d	6781
	DMP ^e	8554
	DnBP ^f	3026
	DEHA ^g	7641
^a 2-(2-Chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene ^b butyl benzyl phthalate ^c di(2-ethylexyl) phthalate ^d diethyl phthalate ^e dimethyl phthalate ^f di-n-butyl phthalate ^g Diethylhexyl adipate		

2.3.2. Chemical analyses

Analytes were directly extracted then analyzed from the digestate pool using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS/MS) (Lacroix *et al.*, 2014). Briefly, a polydimethylsiloxane stir bars (Twister 20 mm×0.5 mm, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany) was placed in the 100 mL digestate and extractions were carried out on a magnetic laboratory agitator (MIX15, Munich, Germany) set at 700 rpm for 16 h in the dark at room temperature. After the extraction step, the stir-bar were retrieved, rinsed with Evian® water and placed on a gas chromatography system Agilent 7890A coupled with an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Little Falls, USA) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (CIS) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Thermodesorption was performed at 280°C for 6 min and samples were then cryofocused in the CIS at -10°C. Injection in the GC-MS/MS system was realized in splitless mode and the CIS was heated to 300°C at 12°C/s. The GC temperature program was set as follow: 70°C for 0.5 min,

then increase to 150°C at 20°C/min and finally increase to 300°C at 7°C/min and maintained for 5 min. An Rxi-5MS (30 m, 0.25 mm, 25 µm thickness) (Restek, Lisses, France) capillary column was used. Helium was used as a carrier gas with a constant flow rate of 1 mL/min.

Limits of quantification (LOQ) were calculated according to Shrivastava *et Gupta* (2011) using the calibrations curves method. Limits of detection (LOD) were calculated by dividing the LOQ by 3.3. Calibration curve were realized using mussels tissues digested in 10% KOH for 3 h at 80°C added with standard chemicals. Analytes were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 10 ng. Standard were obtained from LGC Standard (Wesel, Germany) and Interchim (Montluçon, France).

2.4. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R Statistical Software version 3.4.0 (R Core Team, 2015). As hypothesis of residuals normality, tested using Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity, tested on regression residues, were not verified, non-parametric Kruskal-Wallis test were performed instead of ANOVA. When

significant differences were highlighted, post-hoc test using the Fisher's least significant difference (LSD) criterion and Bonferroni correction was applied using the agricolae package (1.2-7) (De Mendiburu, 2014). Microplastic color, sizes classes and polymer composition were compared with Chi-Square. Data were summed to meet application requirements (Cochran, 1952). Relationships between MP or anthropogenic particle (AP) load and HOC or plastic additive concentration in bivalves were assessed using the corrplot package (0.84) (Wei *et al.*, 2017). Differences were considered significant when p-value was below 0.05. Results are expressed as a mean \pm 2 standard error (S.E.), representing the 95% confidence interval (95% CI).

3. Results and discussion

3.1. Biometric parameters

Mussels from LP and BdV measured 47.3 ± 1.2 mm and 47.9 ± 1.5 mm and respectively weighted 3.5 ± 0.5 g (wet weight) and 5.7 ± 0.6 g. Cockles from BA and BdV respectively measured 35.2 ± 0.4 mm and 27.3 ± 0.5 mm and weighted 3.2 ± 0.1 g and 3.0 ± 0.2 g. So, in mean, cockles and mussels measured legal market sizes: 27 mm and 30 mm for cockles for respectively professional and recreational fishing and 40 mm for mussels for recreational and professional fishing (LegiFrance, 2018; Préfecture de Haute Normandie, 2015; Préfecture de Normandie, 2016).

3.2. Microplastics in mussels and cockles

Fibers could not been analyzed with μ -Raman spectroscopy mainly because of their instability

under the microscope. Some particles were classified as pigment containing particles as no confirmation of plastic composition could be made. Together with fibers, pigment containing particles were not taken in account in MP contamination results.

Overall, 1636 particles were visually sorted in the 200 bivalves sampled at BA, LP and BdV. Among them, 324 were fibers varying from 2.4 to 50.2% of particles according to sites and species. A total of 1312 particles was analyzed with μ -Raman spectroscopy and identified as MP, pigments, natural particles, or were not identified (Table 2). The identified particles correspond to MP (5 to 32.8%), pigments containing particles (0 to 2.5%), and natural particles (6.6 to 21.5%) (Table 2). Unidentified particles with μ -Raman account for 27 to 60.9% of analyzed particles (Table 2). Absence of identification was due to no peak in particle spectrum, to saturated signal due to high fluorescence or to spectrum absent in databases. Overall, natural particles (6.6 to 21.5%) were mainly composed of minerals (quartz), organic and inorganic carbon corresponding to sand or shell particles (Table 2). The majority of pigmented particles contained a blue pigment known as the phthalocyanine blue 15 (PB15). As this pigment is used in the plastic industry, it can be attributable to plastic (Lewis, 2005). Such pigmented particles were also found in mussels sampled in Germany (Van Cauwenberghe *et al.*, 2014). Nevertheless, these could not be rigorously considered as MP since these pigmented particles could also be paint particles, as demonstrated by Imhof *et al.* (2016).

Table 2. Particles analyzed by μ -Raman spectroscopy and fibers visually sorted from mussels and cockles. Results are expressed in terms of number of particles and percentage (in *italic*). LP: Le Portel; BdV: Baie des Veys; BA: Baie d'Authie.

Species	Sampling site	Fiber ^a	Unidentified particles ^b	Identified ^b			Total
				Natural particles ^c	Microplastics	Pigments	
Mussel	LP	77	465	164	38	19	763
		<i>10.1%</i>	<i>60.9%</i>	<i>21.5%</i>	<i>5.0%</i>	<i>2.5%</i>	<i>100%</i>
Mussel	BdV	121	65	16	39	0	241
		<i>50.2%</i>	<i>27.0%</i>	<i>6.6%</i>	<i>16.2%</i>	<i>0%</i>	<i>100%</i>
Cockle	BA	9	169	65	123	9	375
		<i>2.4%</i>	<i>45.1%</i>	<i>17.3%</i>	<i>32.8%</i>	<i>2.4%</i>	<i>100%</i>
Cockle	BdV	117	73	39	28	0	257
		<i>45.5%</i>	<i>28.4%</i>	<i>15.2%</i>	<i>10.9%</i>	<i>0%</i>	<i>100%</i>

^a Not analyzed by μ -Raman

^b Analyzed by μ -Raman

^c Natural particle included minerals, organic and inorganic carbon.

For mussels sampled at LP, MP were identified in 17 mussels (34%) whereas 23 mussels (46%) from BdV were contaminated by MP. For cockles from BA, 29 (58%) individual were contaminated by MP whereas 21 cockles (42%) from BdV were contaminated (Table 3). The presence of MP in cockles and mussels from the four sites varied from 0.56 ± 0.22 MP/individual, namely 0.19 ± 0.08 MP/g of tissue wet weight (ww) for cockle from BdV to 2.46 ± 1.16 MP/individual, namely 0.74 ± 0.35 MP/g of

tissue ww for cockle from BA (Table 3). MP contamination in mussels and cockles was significantly different according to location and species (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Cockles sampled at BA were more contaminated by MP (Post-hoc after Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) in comparison with mussels sampled at LP and cockles sampled at BdV. These differences were observed for results expressed as MP/individual and MP/g of tissue ww (Table 3).

Table 3: Microplastics (MP), fibers, pigmented particles and total (MP+fiber+pigment) contamination of mussels and cockles sampled at Le Portel (LP), Baie d’Authie (BA) and Baie des Veys (BdV). Particles identification as MP and pigmented particles were obtained after μ -Raman spectroscopy. Results are expressed as mean \pm 95% confidence interval. Superscript letter correspond to the differences after post-hoc test using the Fisher’s least significant difference with Bonferroni correction ($p < 0.05$).

	Mussel		Cockle	
	LP	BdV	BA	BdV
% of contaminated individual by MP	34 %	46%	58 %	42 %
MP/individual	0.76 \pm 0.40 ^a	0.78 \pm 0.30 ^{a b}	2.46 \pm 1.16 ^b	0.56 \pm 0.22 ^a
MP/g of tissue ww	0.25 \pm 0.16 ^a	0.15 \pm 0.06 ^{a b}	0.74 \pm 0.35 ^b	0.19 \pm 0.08 ^a
% of contaminated individual by fiber	40 %	80 %	16 %	80 %
Fiber/individual	1.54 \pm 1.2 ^a	2.42 \pm 0.55 ^b	0.18 \pm 0.12 ^c	2.34 \pm 0.77 ^b
Fiber/g of tissue ww	0.49 \pm 0.42 ^a	0.44 \pm 0.1 ^b	0.06 \pm 0.04 ^c	0.82 \pm 0.28 ^b
% of contaminated individual by pigmented particles	24 %	0 %	8 %	0 %
Pigment/individual	0.38 \pm 0.23 ^a	0 ^b	0.18 \pm 0.2 ^b	0 ^b
Pigment/g of tissue ww	0.12 \pm 0.07 ^a	0 ^b	0.06 \pm 0.06 ^b	0 ^b
% of contaminated individual by all categories	68 %	86 %	72 %	86 %
Total/individual	2.68 \pm 1.33 ^a	3.20 \pm 0.60 ^b	2.82 \pm 1.14 ^{a b}	2.90 \pm 0.77 ^{a b}
Total/g of wet tissue	0.86 \pm 0.47	0.59 \pm 0.12	0.86 \pm 0.34	1.02 \pm 0.28

In the present study, quantities of MP, *sensus stricto*, recorded in the bivalves along French coasts of the English Channel were in accordance with studies from other European coasts (Table 4) where contamination in bivalve varied from 0.04 \pm 0.09 MP/g of tissue ww in Mediterranean blue mussels (*M. galloprovincialis*) sampled at Erbo Delta, Spain to 4.44 MP/g of tissue ww for blue mussels (*M. edulis*) sampled at Oban in Scotland (Table 4). In this work and others made in Europe, MP contamination appeared to be more influenced by location than by species even though number of species investigated is limited. However, MP contamination in the two bivalves species is lower than contamination found in bivalves sampled along Chinese coasts (Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016b) (Table 4). Mussels along the Chinese coasts were contaminated by 0.9 to 4.6 MP/g (Li *et al.*, 2016b). These differences are likely due to MP contamination level of the

studied sites. Indeed, Chinese environments were reported to be highly contaminated by MP and other plastic debris (Cai *et al.*, 2018).

Table 4. Overview of work studying microplastics contamination in bivalves across the globe.

Species	Individuals	Ingestion rate (%)	MP/individual	Polymer chemical identification	Fiber considered as MP	Sampling location	Reference
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	100	-	0.34 ± 0.33 p/g	Hot Needle	Yes	Tagus estuary, Portugal	[5]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	100	-	0.05 ± 0.11 p/g	Hot Needle	Yes	Po estuary, Italy	[5]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	25	-	0.15 ± 0.33 p/g	Hot Needle	Yes	Fangar Bay, Spain	[5]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^a	25	-	0.25 ± 0.26 p/g	Hot Needle	Yes	Coro, Italy	[5]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^a	100	-	0.04 ± 0.09 p/g	Hot Needle	Yes	Ebro delta, Spain	[5]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^a	18	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> ^b	80	46,3	1.9 ± 0.2	FTIR	Yes	Ionian Sea, Greece	[14]
<i>Mytilus edulis</i>	25	-	0.06 ± 0.13 p/g	Hot Needle	Yes	Saint Brieuc bay, France	[5]
<i>Mytilus edulis</i>	25	-	0.32 ± 0.22 p/g	Hot Needle	Yes	Inschot, Netherlands	[5]
<i>Mytilus edulis</i>	36	-	0.36 ± 0.07 p/g	Raman	Yes	North sea, Germany	[3]
<i>Mytilus edulis</i>	-	-	0.2 ± 0.3 p/g	Raman	No	North sea	[4]
<i>Mytilus edulis</i>	45	-	0.37 p/g	None	Yes	North sea, Belgium	[1]
<i>Mytilus edulis</i>	390	-	1.5 – 7.6 (0.9 – 4.6 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[6]
<i>Mytilus edulis</i>	-	97	1.05 – 4.44 p/g	FTIR	Yes	Oban, Scotland	[9]
<i>Mytilus edulis</i>	120	-	0.60 ± 0.56 (0.23 ± 0.20 p/g)	FTIR	Yes	Atlantic coast, France	[10]
<i>Mytilus edulis</i>	162	100	1.1 – 6.4 (0.7 – 2.9 p/g)	FTIR	Yes	United Kingdom coast	[11]
<i>Mytilus trossulus</i>	450	-	0.04 ± 0.19 (0.26 ± 1.3 p/g)	FTIR	Yes	Baltic sea	[13]
<i>Crassostrea gigas</i>	11	-	0.47 ± 0.16 p/g	Raman	Yes	Atlantic ocean	[3]
<i>Crassostrea gigas</i> ^a	12	33,3	0.6 ± 0.9 (2.10 ± 1.71 p/g)	None	Yes	Pacific ocean	[2]
<i>Crassostrea gigas</i>	60	-	2.10 ± 1.71 (0.18 ± 0.16 p/g)	FTIR	Yes	Atlantic coast, France	[10]
<i>Saccostrea cucullata</i>	330	100	1.7 – 4.0 (1.5 – 7.2 p/g)	FTIR	Yes	Pearl River Estuary, China	[12]
<i>Venerupis philippinarum</i>	27	100	8.4 ± 8.5 (0.9 ± 0.9 p/g)	None	Yes	British Columbia, Canada	[7]
<i>Venerupis philippinarum</i>	27	100	11.3 ± 6.6 (1.7 ± 1.2 p/g)	None	Yes	British Columbia, Canada	[7]
<i>Venerupis philippinarum</i> ^a	24	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Scapharca subcrenata</i> ^a	6	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]

<i>Tegillarca granosa</i> ^a	18	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Patinopecten yessoensis</i> ^a	6	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Alectryonella plicatula</i> ^a	18	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Sinonovacula constricta</i> ^a	6	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Meretrix lusoria</i>	18	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]
<i>Cyclina sinensis</i>	30	-	4.3 – 57.2 (2.1 – 10.5 p/g)	FTIR	Yes	Chinese coasts	[8]

^a Individuals sampled on local market; ^b Research of MP in gills and digestive gland
 “-“ : No data; p/g: Particle/g of tissue wet weight; FTIR: Fourier Transform Infra-Red

Références bibliographique : [1] De Witte *et al.* (2014); [2] Rochman *et al.* (2015b); [3] Van Cauwenberghe et Janssen (2014); [4] Van Cauwenberghe *et al.* (2015); [5] Vandermeersch *et al.* (2015a); [6] Li *et al.* (2016b); [7] Davidson et Dudas (2016); [8] Li *et al.* (2015); [9] Courtene-Jones *et al.* (2017); [10] Phuong *et al.* (2018a); [11] Li *et al.* (2018c); [12] Li *et al.* (2018a); [13] Railo *et al.* (2018); [14] Digka *et al.* (2018)

Among the 228 MP found in mussels and cockles, five different polymers and one copolymer were identified using μ -Raman spectroscopy: PE, PP, PS, ABS, PET and styrene butadiene rubber (SBR) copolymer. PE, ABS and SBR were the most common polymers found in the cockles and mussels sampled with respectively 36.8%, 32.5% and 26.3% of all identified MP. Each other polymer represented less than 5% of the MP found in the bivalves. Proportions of polymers found in bivalves according to species and sampling sites were significantly different (Chi-square, $p < 0.001$) (Fig. 2A). Indeed, PE was mainly found in mussels sampled at BdV and LP and in cockles sampled at BdV whereas ABS and SBR were mainly found in bivalves sampled in BA and LP. Moreover, PP was only found in cockles sampled at BdV (Fig. 2A). PE is common in our samples which is in accordance with the available literature as PE is one of the most common polymer found in marine environment (Rezania *et al.*, 2018) and it is the first polymer product worldwide (Geyer *et al.*, 2017; PlasticsEurope, 2018). Polymers found in cockles sampled at BA were enriched in SBR in comparison with other sites (Fig. 2A). SBR is a polymer mainly used to make tires (Hao *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2018) which could be a source of MP in marine environment (Rochman, 2018). Moreover, this plastic polymer is also used in road materials (Sundt *et al.*, 2014). However, the particles identified as SBR were not all black, less supporting the hypotheses that these particles could come from tires or road material. MP colors varied significantly depending on sampling site and species (Chi-square, $p < 0.001$) (Fig. 2B). For all sampling sites and species, the color blue was dominated in all samples with 24% and 69% of MP found in mussels sampled at LP and BdV and 36% and 61% in cockles sampled at BA and BdV (Fig. 2B). Other colors representing important proportions were black, transparent, pink, brown and green (Fig. 2B). Here differences in polymers and particles colors found in bivalves could be related to differences in sources of plastic in the studied sites.

No significant differences were found for MP size classes depending on species and sampling sites (Chi-square, $p = 0.17$) (Fig. 2C). Globally for all 228 MP identified, size classes were represented as follow: 31.7% $< 50 \mu\text{m}$, 34.8% $50 - 100 \mu\text{m}$, 32.6% $100 - 500 \mu\text{m}$ and 0.9% $> 500 \mu\text{m}$. Majority of the MP measured less than $100 \mu\text{m}$ (66.5%). It is in agreement with recent studies finding that 83% of MP found in mussels sampled on the French Atlantic coast measuring below $100 \mu\text{m}$ (Phuong *et al.*, 2018a). The presence of smaller MP in both shellfish species reflects the fact that bivalves preferentially ingest small particles. Indeed, mussels ingest preferentially particles measuring $7 - 35 \mu\text{m}$ (Strohmeier *et al.*, 2012) and cockles ingest particles measuring $7 - 11 \mu\text{m}$ (Iglesias *et al.*, 1992). In addition, plastic particles numbers tend to increase with decreasing particles sizes (Erni-Cassola *et al.*, 2017).

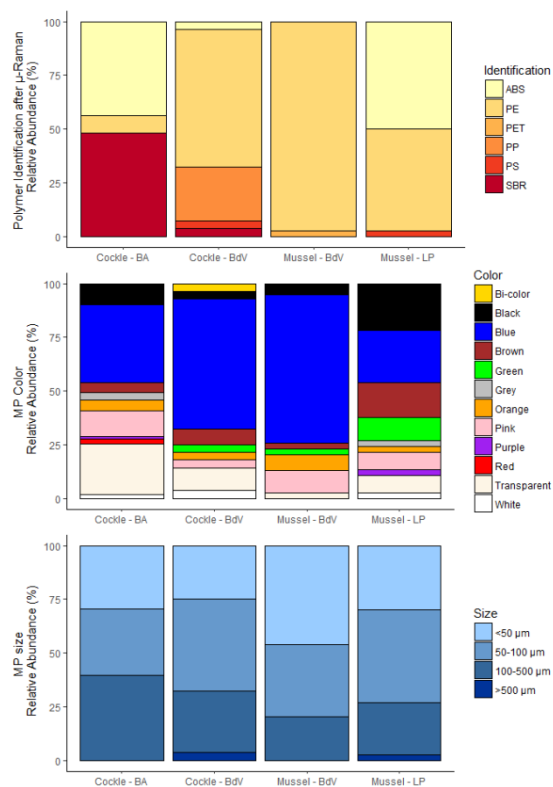


Fig. 2. Relative abundance of polymer identification (A), color (B) size classes (C) of microplastics (MP) found in mussels and cockles sampled at Le Portel (LP), Baie d’Authie (BA) and Baie des Veys (BdV). Microplastics were identified as polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), acrylonitrile butadiene styrene (ABS), styrene butadiene rubber (SBR) and polyethylene terephthalate (PET).

It is important to be aware that considering all fibers recorded as plastic particles could overestimate the contamination. According to [Hermesen et al. \(2017\)](#), studies with the lowest MP incidence in fish are those using clean air condition, high quality assurance criteria and polymer identification. Moreover, [Dris et al. \(2016\)](#) demonstrated that fibers identification using chemical approaches is important. Indeed, only 29% of analyzed fibers could be considered as plastics while others fibers were made of cotton ([Dris et al., 2016](#)). Same type of results were recently found in mussels sampled in the United Kingdom with some fibers ($\approx 10\%$) identified as natural particles ([Li et al., 2018c](#)). In some studies, fibers were accurately identified as plastic particles ([Courtene-Jones et al., 2017](#); [Murray et al., 2011](#); [Phuong et al., 2018a](#)) but in other studies fibers or others particles were not identified using chemical analyses ([Davidson et al., 2016](#); [De Witte et al., 2014](#); [Santana et al., 2016](#)) (Table 4). Fibers should be included in MP count only if they are identified as plastic particles.

Fibers were found in all samples (Table 3). Mussels and cockles from BdV were significantly (Post-hoc after Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) more contaminated with respectively 2.42 ± 0.55 fiber/individual, namely 0.44 ± 0.10 fiber/g of tissue ww and 2.34 ± 0.77 fiber/individual, namely 0.82 ± 0.28 fiber/g of tissue ww, in comparison with mussels and cockles sampled at LP and BA (Table 3). Fibers and MP were found in bivalves from all sampling sites whereas pigments containing particles were only found in bivalves sampled at LP and BA (Table 2). Pigmented particles were found in 12 mussels (24%) from LP with 0.38 ± 0.23 pigment/individual (0.12 ± 0.07 pigment/g of tissue ww) and were found in 4 cockles (8%) from BA with 0.18 ± 0.2 pigment/individual (0.06 ± 0.06 pigment/g of tissue ww). Globally, for mussels, all categories of particles (MP+fiber+pigment) were found in 34 individual (68%) from LP and 43 mussels (86%) from BdV (Table 3). In BdV, 43 cockles (86%) were contaminated while all types of particles were found in 36 cockles (72%) from BA (Table 3).

Level of MP+fiber+pigment contamination was significantly higher in mussels sampled at BdV in comparison with mussels sampled at LP (3.20 ± 0.60 vs 2.68 ± 1.33 MP+fiber+pigment/individuals respectively, Post-hoc after Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Fibers were the dominant form found in mussels and cockles sampled from BdV (Table 2). The Baie des Veys is influenced by two rivers with a total mean discharge of $53 \text{ m}^3/\text{s}$ ([Grangeré et al., 2009](#)) and could also be influenced by the Seine depending on meteorological conditions ([Ellien et al., 2004](#)). As MP found in the Seine river are mainly in form of fibers ([Dris et al., 2015](#)), the Seine could contaminate mussels and cockles of the BdV with fibers.

3.3. Hydrophobic organic compounds and plastic additives concentrations in mussels and cockles

The second objective of this study was to combine particular and chemical analyses to test if chemical pollutants can be a proxy of plastic contamination by comparing particles and chemical analyses. HOC and plastic additives were detected in bivalve digestates (Fig. 3) at relatively low levels in comparison with commonly reported levels in coastal and estuaries areas.

PAH were detected in mussels and cockles from BdV at 5.48 ± 3.09 ng/g and 0.06 ± 0.02 ng/g, respectively. The most abundant compound was phenanthrene (24-32% of Σ PAH). PAH concentrations are far below levels found in mussels from the Bay of Brest (France) (639 ± 73 ng/g and 492 ± 44 ng/g) and Barcelona (Spain) ($273 - 405 \text{ }\mu\text{g/kg}$ dry weight) ([Lacroix et al., 2017](#); [Porte et al., 2001](#)). However, PAH concentrations are in the range of those found in mussels and clams sampled in Milan market (Italy): not detected (n.d) - 13.95 ng/g and n.d - 4.35 ng/g ([Chiesa et al., 2018](#)). To identify possible PAH sources in the samples, ratios between PAH isomers were calculated for mussel tissues collected at BdV sampling site. According to [Wang et al. \(2008\)](#), a wide range of PAH and other organic compounds can be formed during combustion of organic materials by a series of

complex chemical reactions. Due to thermodynamic characteristics of the PAH and to the differences in their formation heat, it is possible to distinguish the most stable isomers from the least stable isomers and thus to differentiate their sources. The ratios between phenanthrene and anthracene (R1) and between fluoranthene and pyrene (R2) were calculated to differentiate pyrogenic PAH ($R1 < 10$ and $R2 < 1$), petrogenic PAH ($R2 > 1$) or a mix of both source ($R1 > 10$) (Wagener *et al.*, 2010). As the values of these two ratios were higher than 10 (11.03 to 12.36) and 1.0 (3.96 to 9.45) respectively for R1 and R2, it indicates that PAH found in mussels sampled from BdV may be associated to both petrogenic and pyrogenic sources. As plastic are derived from petroleum, petrogenic source alone should be found if PAH contamination in bivalves were only caused by plastic ingestion.

PCB were only found in mussels sampled at BdV with 1.00 ± 0.59 ng/g, PCB 105 being the most concentrated congener. PCB concentration in mussels from BdV were below concentrations found in mussels sampled at Milan market (Italy) (n.d – 49.2 ng/g) (Chiesa *et al.*, 2018) or sampled at Le Conquet (France) (10.46 ng/g dry weight) (Bodin *et al.*, 2007). Moreover, the PCB concentration found in mussels from the BdV, a non-polluted area, are far below concentrations recorded in mussels (538.45 ng/g dry weight) sampled at Antifer, Bay of Seine (France) which is a highly polluted estuary (Bodin *et al.*, 2007). Organochloride pesticides (OCP) were recorded in mussels from BdV and cockles from BA at concentration of 0.23 ± 0.12 ng/g and 0.04 ± 0.08 ng/g respectively (Fig. 3). These levels are below the concentrations found in mussels (max: 7.58

ng/g dry weight) from the Adriatic Sea (Kožul *et al.*, 2009). Phthalates were the most concentrated pollutants in digestates for all samples (Fig. 3). Average Σ Phthalate were respectively 26.36 ± 18.16 ng/g, 75.53 ± 12.49 ng/g and 29.18 ± 27.23 ng/g for mussels sampled at BdV and cockles samples at BA and BdV with DEHA or DMP being the most concentrated phthalates for all samples (50-98% of Σ Phthalate). These results are in accordance with studies on the contamination of mussels and oysters by phthalates at False creek, Vancouver, Canada. In the study by Mackintosh *et al.* (2004), mean $\Sigma P_{\text{ththalate}}$ (including DEP, diisobutyl phthalate (DiBP), DnBP, DEHP, di-n-octyl phthalate (DnOP) and dionylphthalate (DNP)) were 17.27 ng/g and 16.78 ng/g for mussels and oysters respectively. However, as phthalates studies by Mackintosh *et al.* (2004) are not the same, comparison have to be made carefully. In another study, Blair *et al.* (2009) found 585 ng/g wet weight for the monobutyl phthalate (MnBP) in mussel tissue. Finally, PBDE were detected in both species from all the sampling locations with 0.07 ± 0.05 ng/g, 0.23 ± 0.45 ng/g and 1.16 ± 1.71 ng/g for mussels from BdV and cockles from BA and BdV, respectively (Fig. 3). These are below concentrations found in mussels from the coast of Spain (0.229 ng/g) and France (2.71 – 9.88 ng/g) (Bellas *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2006). Overall, the contaminant levels found in soft tissue of bivalves are low and may not represent a danger for seafood consumption. Indeed, for PCB, the regulatory threshold is fixed at 75 ng/g in Europe (European Commission, 2011). No regulatory threshold exists in Europe for plastic additives in seafood products.

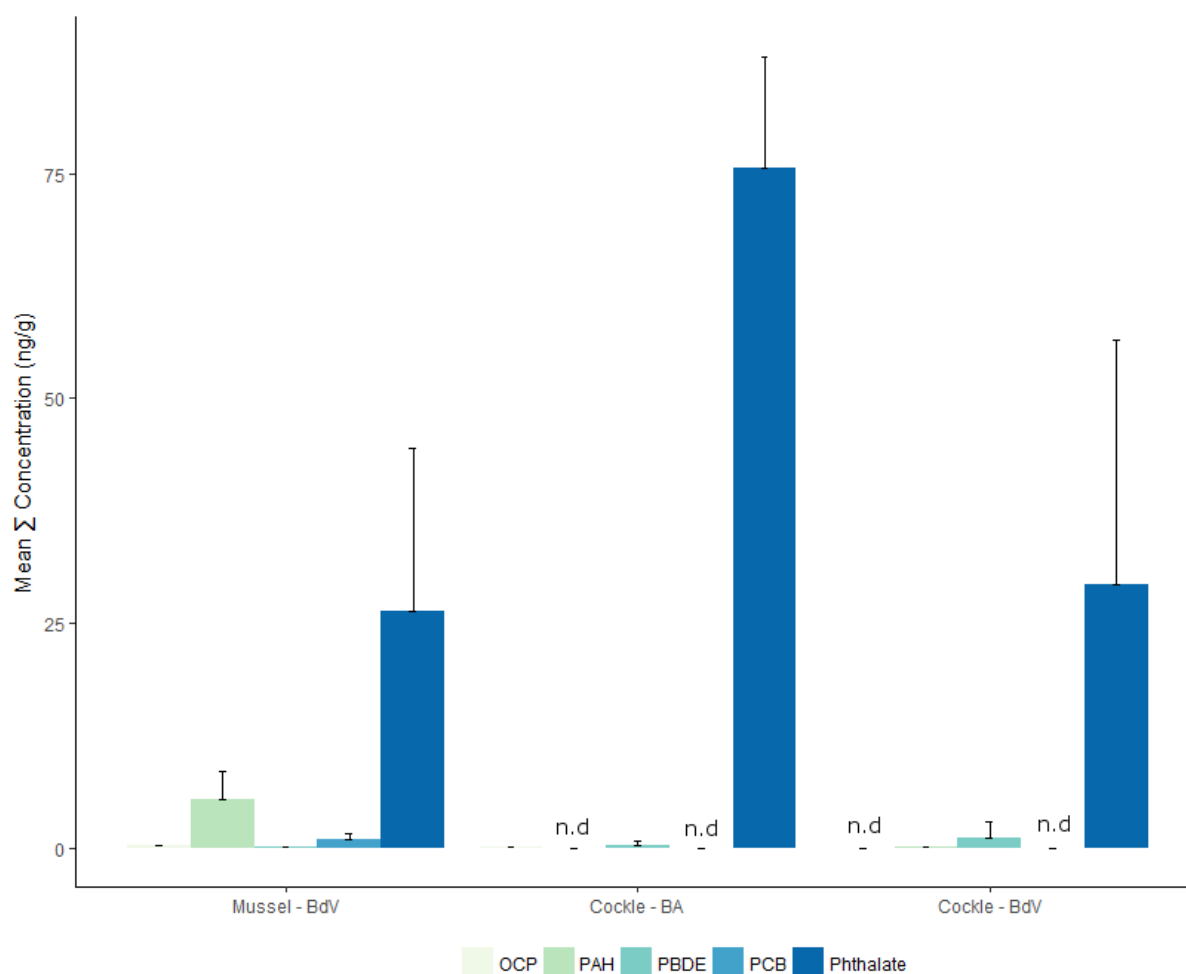


Fig. 3 Mean concentration (ng/g) of Σ_{PAHs} , Σ_{OCP} , Σ_{PBDE} , Σ_{PCB} and $\Sigma_{\text{Phthalate}}$ (+ confidence interval 95%) in mussels sampled at BdV (n=2) and cockles sampled at BA and BdV. n.d: values below limit of detection. LP: Le Portel; BA: Baie d’Authie; BdV: Baie des Veys.

No statistical trend between MP contamination and HOC or plastic additive concentrations was found possibly because of the low number or concentrations of MP found in the sampled bivalves. Previous studies have demonstrated that HOC or plastic additives could be used as indicators for MP contamination in marine mammals, birds or fish (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014; Rochman *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2013). Plastic additives are not commonly studied despite the fact that plastics are sources of these chemicals in the environment and for marine organisms (Hermabessiere *et al.*, 2017). Indeed, Jang *et al.* (2016) demonstrated that mussels (*Mytilus galloprovincialis*) living on expanded polystyrene (ePS) buoys concentrated more hexabromocyclodecane (HBCD) than mussels living on other substrates. As HBCD is a

plastic additive present in ePS buoys, Jang *et al.* (2016) suggested that transfer occur when mussels ingest ePS particles. To date, this is the only reported relationship between MP contamination and plastic additive concentration in bivalve. It is then of great interest to monitor both as effects of MP was demonstrated experimentally in mussels on the ability to depurate PAH (*i.e.* Fluoranthene) (Paul-Pont *et al.*, 2016).

4. Conclusion

This study is the first to describe MP contamination in commercially important bivalves from the French English Channel coast and the first to evaluate the microplastic contamination of the cockle *Cerastoderma edule*. The present work contributes to the assessment of

MP contamination in bivalves used as seafood and highlights some important points. Formal identification for MP studies is mandatory and has to be performed for all studies on MP pollution to insure correct estimations. In future works, if fibers are not identified they should be considered but not as MP, *sensus stricto*. Accurate data using bivalves above the minimum catching size will help to estimate the risk of human exposure to MP via the ingestion of seafood products. Future risk assessment studies should be done to determine potential effects of MP on human health. To do so, methods for multiple foodstuffs must be standardized to allow data comparison and risk assessment calculations. In this work, no relationship between MP contamination of bivalves and the concentration of HOC or plastic additive could be shown probably due to the low number of MP found in the bivalves soft tissues. However, quantifying plastic additives in bivalves constitute interesting data as these chemicals can leach out from the plastic and may serve in the evaluation of food safety.

Acknowledgments

Ludovic Hermabessiere PhD was funded by the Hauts-de-France Region and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety). The authors would like to thank Julien Normand (IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources de Normandie) for mussels and cockles sampling at the Baie des Veys. This work was funded by ANSES through a “Convention de Recherche et Développement” (2015-CRD-11), by the ANR Nanoplastics project (ANR-15-CE34-0006) and by the French government and the Hauts-de-France Region in the framework of the project CPER 2014-2020 MARCO.

II Contamination d'espèces de poissons

II.1 Introduction

L'ingestion des MP par les poissons est un phénomène documenté pour une multitude d'espèces (Chapitre 1). En effet, la présence de MP a été détectée dans 106 espèces différentes de poissons ayant un intérêt commercial (Chapitre 1). Néanmoins toutes ces études (n=36) ont seulement été effectuées sur la contamination du TGI par les MP. A ce jour, seulement deux études ([Abbasi et al., 2018](#); [Akhbarizadeh et al., 2018](#)) ont été entreprises pour déterminer la contamination des parties consommables de poissons par les MP, c'est à dire les filets. La contamination de ces filets est conditionnée par la possible translocation de MP dans ces organes ([Avio et al., 2015b](#); [Browne et al., 2008](#); [Collard et al., 2017a](#)). Si le phénomène de translocation est avéré, la consommation des filets contaminés par des MP peut représenter un danger en santé humaine. De plus, certains polluants organiques hydrophobes ainsi que les additifs plastiques peuvent être associés aux MP ([Rani et al., 2017b](#); [Rani et al., 2015](#); [Teuten et al., 2009](#)). Des auteurs utilisent d'ailleurs certains additifs plastiques comme proxy de la contamination aux MP dans les organismes ([Fossi et al., 2012](#); [Fossi et al., 2014](#); [Tanaka et al., 2013, 2015](#)).

Les objectifs de ce travail étaient de (i) quantifier la contamination dans les TGI et les filets par les MP dans plusieurs espèces de poissons consommés communément en France par l'Homme, de (ii) quantifier la concentration de certains polluants organiques hydrophobes et additifs plastiques dans les filets de ces poissons et (iii) d'explorer les relations entre contamination aux MP et concentration des polluants dans les filets de poissons.

Les 3 espèces utilisées sont des espèces ayant un intérêt économique important ([FranceAgriMer, 2017](#)). Le merlan, le maquereau et la sole sont, en volumes et en 2016, les 5^{ème}, 6^{ème} et 11^{ème} espèces les plus consommées en France, respectivement avec la sole comme première espèce consommée de poisson plat ([FranceAgriMer, 2017](#)).

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Echantillonnage

Les soles (*Solea solea*), les maquereaux (*Scomber scombrus*) et les merlans (*Merlangius merlangus*) ont été acquis chez des pêcheurs locaux (Boulogne sur mer). Les 50 poissons de chaque espèce ont été capturés entre mars-mai 2016, en Manche orientale ou en mer du Nord (Figure 20). Une fois au laboratoire, les poissons ont été mesurés à l'aide d'un ichtyomètre afin d'avoir la taille totale et la taille standard (jusqu'à la base de la nageoire caudale). La

masse totale des animaux a été obtenue avec une balance précise à 0,01 g (Sartorius CP3202S, Dourdan, France). Les poissons ont ensuite été disséqués afin de récupérer les TGI (de la bouche à l'anus) et les deux filets (Filet 1 et 2) qui ont été pesés comme précédemment. Les filets F1 et F2 correspondent respectivement aux flancs gauche et droit du poisson. Les échantillons ont été placés dans de l'aluminium puis congelés à -20°C en vue de leurs analyses.

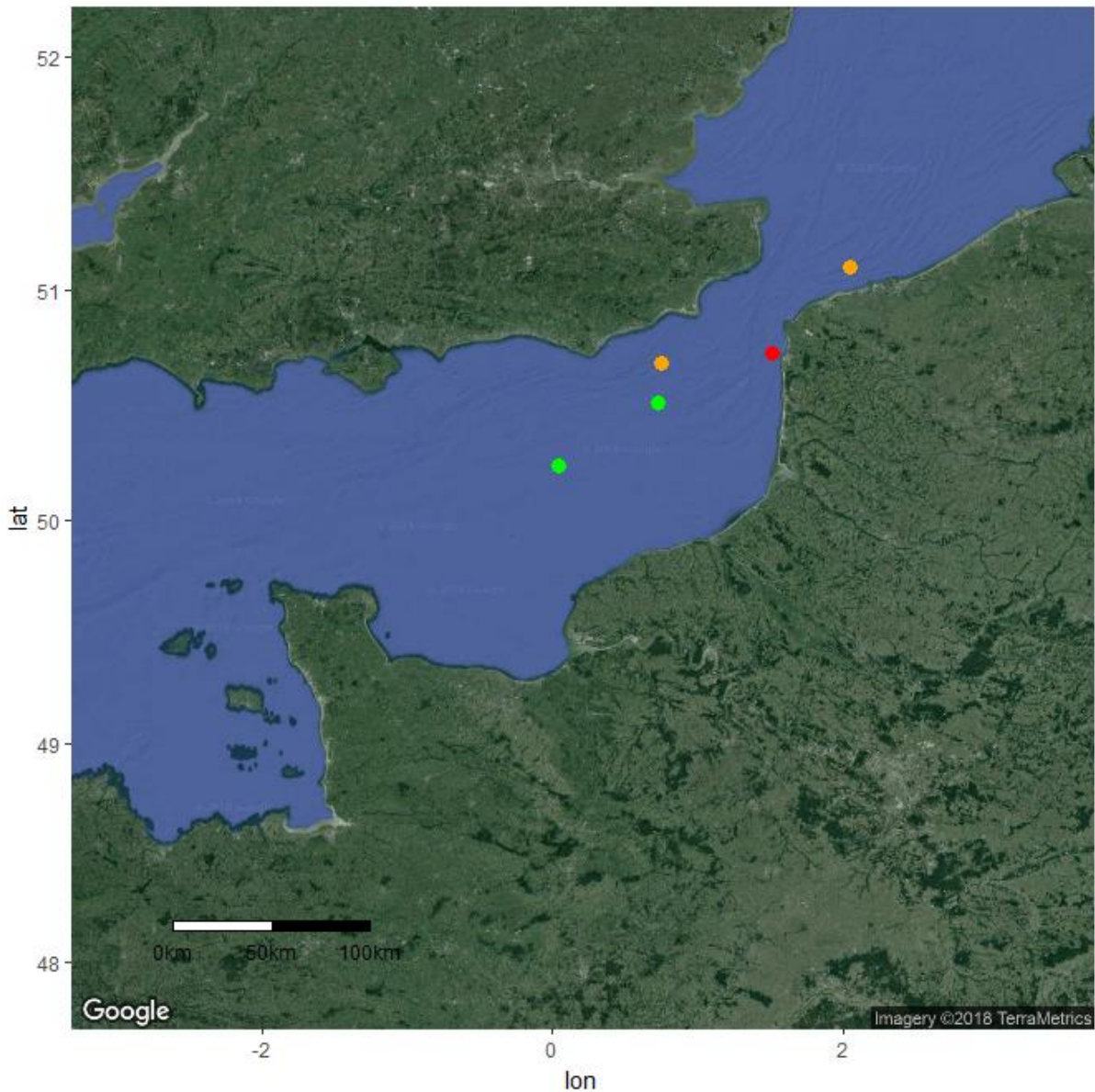


Figure 20 : Carte d'échantillonnage des poissons (Soles, Maquereaux et Merlans) en Manche orientale et en mer du Nord. Le point rouge correspond à la localisation de pêche des Soles, les points verts correspondent aux localisations de pêche des Maquereaux et les points orange à ceux des Merlans.

II.2.2 Analyse des microplastiques

II.2.2.1 Digestion-Filtration des échantillons

Les digestions-filtrations des échantillons ont été réalisées d'après la méthode de [Dehaut *et al.* \(2016\)](#) (Chapitre 2). Après 2h de décongélation, les échantillons sont placés dans des erlenmeyers de 300 ou 1000 mL puis le KOH 10% (p/p) est ajouté (ChimiePlus, Saint Paul de Varax, France). Le volume de KOH 10% était de 500 mL pour les filets et il a été ajusté en fonction des poids pour les TD en utilisant un ratio de 30 mL/g de chair. Les digestions ont été effectuées dans une enceinte thermostatée et réglée à $60 \pm 1^\circ\text{C}$ (Binder BD 240, Tuttlingen, Allemagne) pendant 24h avec une agitation magnétique réglée sur 300 rpm (2mag MIXDrive 6 HT, Munich, Allemagne). Après les 24h de digestion, les échantillons sont filtrés sur filtre GF/A de porosité $1,6 \mu\text{m}$ (Whatman, Vélizy-Villacoublay, France) à l'aide d'un système à vide Büchner. Les filtres ont été conservés dans des boîtes de Pétri en verre en attendant leur observation sous loupe binoculaire.

II.2.2.2 Comptage, tri visuel et identification en Py-GC/MS

Les filtres ont été observés sous une loupe binoculaire Olympus SZ61 équipée d'une caméra DP21 (Olympus, Rungis, France). A chaque fois qu'une particule ressemblant à un MP (MP-like) est observée, celle-ci est comptée puis photographiée afin de mesurer sa taille. Le logiciel GIMP 2 (2.8.16) a permis de déterminer les tailles en utilisant une correspondance entre la taille en pixel des particules et la taille d'une échelle millimétrique. Les particules ont été décrites à l'aide de leurs caractéristiques physiques, formes et couleurs, d'après [Lusher *et al.* \(2017a\)](#). Une fois le comptage réalisé et les MP-like des blancs retranchés, les MP-like potentiels ont été isolés puis analysés en Py-GC/MS. La procédure du retranchement des blancs du compte des MP-like est disponible en Annexe 2 – page 314.

L'identification en Py-GC/MS a été réalisée d'après [Hermabessiere *et al.* \(2018\)](#) (Chapitre 2). Les MP-like ont été introduits manuellement dans des cupules d'analyses (Frontier-Lab, Fukushima, Japon). Les cupules ont ensuite été placées sur un passeur d'échantillon AS-1020 d'un pyrolyseur EGA/PY-3030D (Frontier-Lab, Fukushima, Japon). La pyrolyse des échantillons a été réalisée à 700°C pendant 1 min puis les produits de décomposition ont été injectés avec un ratio de split de 5 ou en mode splitless dans une GC-2010 (Shimadzu, Noisiel, France) équipée d'une colonne RXi-5ms® (60 m, 0,25 mm, $25 \mu\text{m}$ d'épaisseur) (Restek, Lisses, France). Les températures de l'interface pyrolyse et de l'injecteur étaient réglées sur 300°C . Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium avec une vitesse linéaire de 40 cm/s. Le programme du four GC était le suivant : 40°C pendant 2 min puis

augmentation à 13°C/min jusqu'à 261°C puis augmentation jusqu'à 300°C à 6°C/min et un maintien à cette température pendant 5 min. Les spectres de masses ont été obtenus à l'aide d'une MS QP-2010Plus (Shimadzu, Noisiel, France). L'interface était réglée à 300°C, la source d'ions à 200°C et le voltage d'ionisation à 70 eV. Les spectres ont été acquis en mode SCAN de 33 à 5000 m/z avec une fréquence de 2000 Hz. L'identification des MP-like a été réalisée avec le logiciel F-Search (version 4.3) qui permet de comparer les spectres de masses moyens obtenus à ceux d'une bibliothèque commerciale et d'une bibliothèque créée avec des plastiques de référence (Goodfellow, Lille). Le seuil permettant une identification correcte a été fixé à 80%. Si ce seuil n'est pas atteint mais que le pyrogramme contient des produits de pyrolyse, un traitement manuel a été effectué. Les pics des pyrogrammes ont été intégrés et comparés à la littérature disponible (Tsuge *et al.*, 2011), l'identification des pics a été réalisée en utilisant la base de données NIST08 et les indices de rétention linéaires (LRI).

II.2.2.3 Prévention de la contamination

Pour limiter la surestimation due aux dépôts atmosphériques, plusieurs mesures de prévention de la contamination ont été appliquées. Toutes les solutions utilisées pour ce travail (eau bi-distillée, éthanol 70% et KOH 10%) ont été filtrées sur filtre GF/A de porosité 1,6 µm (Whatman, Vélizy-Villacoublay, France) jusqu'à obtention de filtres sans particules. De plus, tout le matériel en verre et les surfaces utilisées ont été rincés 3 fois avec de l'eau bi-distillée filtrée et de l'éthanol 70% filtré. Des blancs « airs » ont été effectués à l'aide de boîtes de Pétri en verre ouvertes à chaque étape de ce travail : dissection, digestion et filtration. Par ailleurs, lors de l'étape de digestion, un témoin négatif KOH, c'est-à-dire du KOH 10% sans échantillon, a été réalisé. Certaines étapes de cette étude ont été réalisées sous hotte aspirante éteinte spécialement dédiée à l'analyse des MP afin de travailler dans une enceinte limitant l'apport de dépôts atmosphériques. Finalement, des blouses en coton ont été portées pendant la réalisation de toutes ces étapes.

Afin de prendre en compte la potentielle contamination aéroportée dans les résultats, les blancs airs et le témoin négatif ont été retirés du compte des MP-like retrouvés sur les filtres. Ceci a été réalisé de la manière suivante : à chaque étape, si un MP-like de même forme et de même couleur est retrouvé dans un des blancs, celui-ci a été soustrait au total des MP-like compté pour l'échantillon concerné (Annexe 2 – page 314).

II.2.3 Analyses des polluants organiques hydrophobes et des additifs plastiques

Les polluants organiques hydrophobes et les additifs plastiques analysés lors de ce travail sont les suivants (Tableau 9).

Tableau 9 : Récapitulatif des produits chimiques dosés dans les digestats de filets de poissons.

Famille des produits chimiques	Produit chimique ou congénère cible	
Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP)	Naphtalène	Fluoranthène
	Biphényle	Benzo(b+k)fluoranthène
	Phénanthrène	Benzo[g,h,i]perylène
Polychlorobiphényle (PCB)	PCB-7	PCB-105
	PCB-28	PCB-156
	PCB-52	PCB-169
Pesticides organochlorés (POC)	Hexachlorobenzène	2-(2-Chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene (2,4-DDE)
	Aldrin	Endrine
	Isodrine	
Polybromodiphényléther (PBDE)	Dieldrine	
	BDE 28	BDE 153
	BDE 47	BDE 154
	BDE 99	BDE 183
Phtalate	BDE 100	
	Phtalate de benzyle et de butyle (BBP)	Phtalate de diméthyle (DMP)
	phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP)	Phtalate de dibutyle (DnBP)
	Phtalate de diéthyle (DEP)	Adipate de bis(2-éthylhexyle) (DEHA)

Pour l'analyse des polluants organiques hydrophobes (HOC) et des additifs plastiques, les chairs de 10 individus ont été mélangées et regroupées en pool afin d'être digérées dans un volume final de 150 ml de KOH 10% d'après le même protocole qu'en section II.2.2.1. Entre 2 (merlan et maquereau) et 4 (soles) pools par espèce ont été analysés pour la quantification des HOC. La masse de chair (en gramme de poids frais) présente dans chaque pool a été calculée afin de rapporter la quantité de chaque produit chimique à une masse de chair. Enfin, le volume de digestat utilisé pour l'extraction des produits chimiques a été pris en compte pour le calcul des concentrations finales exprimées en ng de produits chimiques par g de poids frais. Le barreau aimanté contenant une phase en Polydiméthylsiloxane (Twister 20 mm×0.5 mm, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Allemagne) est ajouté au flacon contenant l'échantillon et mis à agiter pendant 16 heures à la vitesse de 700 rpm, à l'abri de la lumière. Le barreau aimanté « Twister » est ensuite récupéré avec une pince, rincé avec de l'eau EVIAN® avant d'être déposé et séché sur du papier absorbant. Il est ensuite introduit dans son tube de désorption thermique situé sur le passeur d'échantillon.

La désorption thermique des composés concentrés sur la phase de Polydiméthylsiloxane du « Twister » permet d'introduire les analytes dans le chromatographe en phase gazeuse

couplé à un spectromètre de masse en tandem (GC-MS/MS). Cette étape est réalisée par un désorbeur thermique ou « Thermal Desorption Unit » (TDU) monté en série avec un injecteur à programmation de température ou « Cooled Injection System » (CIS). Le barreau est placé dans un tube étanche à l'air situé sur le passeur d'échantillon puis introduit dans le TDU maintenu à la température de 50°C tandis que le CIS est refroidi à -10°C par de l'azote liquide. Le TDU est alors chauffé jusqu'à 280°C à 115°C/min ; la durée de désorption, en mode «splitless», est fixée à 6 minutes. Les molécules ainsi libérées sont condensées dans un insert à chicanes disposé dans le CIS, avant d'être injectées dans la GC-MS/MS par une montée en température rapide (de -10°C à 300°C à 12°C/s).

Le chromatographe en phase gazeuse est un Agilent 7890N (Agilent Technologie, Little Falls, USA) équipé d'un système d'injection multifonctions Combipal MPS2 (Mülheim an der Ruhr, Allemagne) utilisé en mode « splitless ». La température de l'interface est de 300°C. Le programme de température du four est : de 70°C (0,5 min) à 150°C, à 20°C/min, puis 320°C (5 min) à 7°C/min. Le gaz vecteur est de l'hélium à débit constant (1 mL/min). La colonne capillaire est une RXi-5ms® (30 m, 0,25 mm, 25 µm d'épaisseur) (Restek, Lisses, France). Les spectres de masses ont été obtenus à l'aide d'une MS triple quadripôle Agilent 7000. L'analyse quantitative des différents composés est effectuée en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) : l'ion précurseur, obtenu après une première fragmentation au niveau de la source, subit une seconde fragmentation dans la cellule de collision, à une énergie donnée. Deux ions fils sont alors sélectivement détectés, l'un servant à la quantification, l'autre à la confirmation de la nature de la molécule.

Pour chaque matrice, 9 niveaux de concentration ont été préparés. Les niveaux de concentration allaient de 0 à 50 ng injectés pour les échantillons de tissus et 0 à 500 ng/L pour les échantillons d'eau.

Les limites de quantification (LOQ), ont été estimées à partir de la droite d'étalonnage (Shrivastava et Gupta, 2011). La LOQ correspond à la concentration à partir de laquelle la réponse est linéaire, c'est à dire proportionnelle à l'aire du pic obtenu lors de l'analyse et supérieure à la valeur enregistrée dans le blanc analytique. Les limites de détection (LOD), c'est à dire les plus petites valeurs de concentration des analytes pouvant être détectées sont calculées automatiquement à partir des limites de quantification, en divisant la valeur de la LOQ par 3,3.

II.2.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (v3.4.0) (R Core Team, 2015) en utilisant l'interface RStudio (v0.99.903). Des ANOVA à un facteur ont été réalisées après vérification de la normalité, à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et de l'homogénéité des variances, testés sur les résidus de régression. Quand l'ANOVA était significative, un test post-hoc « honest significant difference » (HSD) a été réalisé à l'aide du package agricolae (De Mendiburu, 2014).

Si une des conditions d'application de l'ANOVA n'a pas été respectée, des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ont alors été réalisés. Les tests de Kruskal-Wallis, si significatifs, ont été suivis d'un test post-hoc de « Least significant difference » (LSD) de Fisher corrigé avec la correction de Bonferroni. Ces tests post-hoc ont été effectués en utilisant le package agricolae (De Mendiburu, 2014).

Afin d'explorer les possibles corrélations possibles entre la quantité de MP-like trouvée dans les filets des trois espèces et la concentration de polluants organiques hydrophobes et les additifs plastiques, des matrices de corrélations ont été réalisées avec le package corrplot (Wei *et al.*, 2017). Les corrélations entre les variables ont été explorées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et de Spearman.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%. Le seuil de significativité considéré est $\alpha=5\%$.

II.3 Résultats et discussion

II.3.1 Paramètres biométriques des animaux

Globalement, les maquereaux étaient les plus petits individus en considérant la taille standard suivi des soles puis des merlans (Kruskal-Wallis post hoc, $p<0,05$). La même chose est observée pour les masses totales moyennes des individus ainsi que pour les masses du filet droit (Filet 2) et du TGI (Kruskal-Wallis post hoc ou test post-hoc HSD, $p<0,05$). Pour le poids du filet gauche (Filet 1), en moyenne les maquereaux présentaient des F1 moins gros que chez les soles et les merlans (Kruskal-Wallis post hoc, $p<0,05$) (Tableau 10).

Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres biométriques des individus utilisés dans l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%. Les lettres représentent des différences significatives au seuil $\alpha=5\%$ après des Kruskal-Wallis suivi de test post-hoc. Les différences sont à considérer pour chaque paramètre biométrique en fonction des espèces de poissons.

Organismes	Paramètres biométriques		Moyenne \pm 2 S.E	
Soles	Taille (cm)	(n=50)	28,12 \pm 0,36	a
	Taille standard (cm)	(n=50)	24,61 \pm 0,34	a
	Poids total (g)	(n=50)	208,88 \pm 10,47	a
	Filet 1 (g)	(n=50)	41,29 \pm 2,10	a
	Filet 2 (g)	(n=50)	33,70 \pm 1,99	a ¹
	Tractus gastro-intestinal (g)	(n=50)	8,49 \pm 0,62	a
Maquereaux	Taille (cm)	(n=50)	27,96 \pm 0,41	a
	Taille standard (cm)	(n=50)	23,64 \pm 0,35	b
	Poids total (g)	(n=50)	143,70 \pm 7,05	b
	Filet 1 (g)	(n=50)	30,11 \pm 1,59	b
	Filet 2 (g)	(n=50)	28,71 \pm 1,75	b ¹
	Tractus gastro-intestinal (g)	(n=50)	13,81 \pm 0,82	b
Merlans	Taille (cm)	(n=50)	31,86 \pm 0,51	b
	Taille standard (cm)	(n=50)	26,69 \pm 0,51	c
	Poids total (g)	(n=50)	263,51 \pm 11,40	c
	Filet 1 (g)	(n=50)	41,42 \pm 2,47	a ¹
	Filet 2 (g)	(n=50)	41,57 \pm 2,37	c
	Tractus gastro-intestinal (g)	(n=50)	27,31 \pm 3,33	c

¹ ANOVA suivi d'un test post-hoc HSD.

De manière générale, comme les poissons ont été acquis chez des pêcheurs professionnels, les tailles de ceux-ci sont supérieures aux tailles minimales de pêche (Ifremer, 2018). Ces tailles minimales de pêche sont de 20 cm pour le maquereau, 27 cm pour le merlan et 24 cm pour la sole (Ifremer, 2018) en Manche. A ce jour, peu d'études sur la contamination des TGI ont été réalisées en utilisant des poissons ayant des tailles commerciales (Compa *et al.*, 2018). Un certain nombre d'étude a été réalisé en utilisant des poissons de petites tailles voir même des juvéniles (Bessa *et al.*, 2018; Kühn *et al.*, 2018) et certaines études n'ont pas indiqué pas les tailles des poissons pêchés pour leurs travaux (Brâte *et al.*, 2016; Hermsen *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2013). L'utilisation de poissons ayant des tailles commerciales a entraîné des complications pour la présente étude. En effet, les TGI des merlans et des maquereaux étaient trop gros et ne pouvaient pas être digérés/filtrés avec la méthode utilisée.

Ici, une harmonisation des protocoles pour évaluer la présence de MP chez les poissons doit aussi envisager l'utilisation de mêmes espèces à étudier et en choisissant des espèces avec un intérêt commercial. De plus, l'utilisation de poissons mesurant des tailles commerciales permettra d'évaluer le risque pour le consommateur de produits de la pêche.

II.3.2 Contamination des poissons par les microplastiques

II.3.2.1 Contamination des tractus gastro-intestianux

Contrairement aux soles, suite à des problèmes lors des processus de digestion (Chapitre 2, section II.1.), les TGI de merlans ainsi que ceux de maquereaux n'ont pas pu être digérés. En effet comme montré dans le Chapitre 2, section II.2, la digestion-filtration des TGI de plus de 7,5 et 15 g pour les maquereaux et les merlans, respectivement, est compliquée. Comme, en moyenne les TGI de ces deux espèces sont au-dessus de ces limites, la digestion-filtration n'a pas été entreprise.

Après l'étape de retranchement des blancs, des MP-like ont été retrouvés dans 56% des 50 TGI de soles utilisées dans cette étude avec un total de 28 fibres, 30 fragments et un film. Le niveau de contamination des TGI de soles était de $1,16 \pm 0,41$ MP-like/individu et de $0,29 \pm 0,10$ MP-like/g de chair humide (Tableau 11). Les couleurs de ces particules sont très variées : noir, gris, blanc, bleu, orange, beige, rouge, rose, jaune, marron et violet avec le blanc (50%) et l'orange (23%) comme couleurs dominantes des fibres et des fragments, respectivement.

Tableau 11 : Contamination aux MP-like et aux MP des tractus gastro-intestinaux de soles échantillonnées en Manche. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'intervalle de confiance 95%.

	Sole
% d'individu contaminé par des MP-like	56 %
MP-like/individu	$1,16 \pm 0,41$
MP-like/g de chair humide	$0,29 \pm 0,10$
% d'individu contaminé par des MP	8%
MP/individu	$0,08 \pm 0,08$
MP/g de chair humide	$0,02 \pm 0,02$

Sur les 30 fragments et le film retrouvés dans les TGI de soles, seulement deux ont été clairement identifiées comme des plastiques (Polystyrène (PS)) et un autre fragment présente un pic intense de styrène sans la présence des autres pics caractéristiques du PS. Ce dernier est donc considéré comme une particule potentielle de PS. De plus, le film a été identifié comme un copolymère de PE. Les particules mesuraient entre 161 et 350 μm de longueur maximale et sont de couleur bleue, orange et transparente (Figure 21). Sur les 17 fibres analysées en Py-GC/MS, aucune n'a été identifiée comme du plastique. Une des difficultés rencontrées lors de cette analyse était que visuellement les particules, MP ou non, présentaient souvent les mêmes caractéristiques, rendant la différenciation avant analyse chimique compliquée. Par exemple,

la particule présentée Figure 21B est un MP alors que la particule de la Figure 21C n'est pas identifiée comme MP après Py-GC/MS. Ces deux particules présentaient les mêmes caractéristiques c'est-à-dire une couleur transparente avec une forme de fragment ou de microbille.

En ne prenant en compte que les particules identifiées comme du plastique, la contamination des TGI des soles est de 8% avec $0,08 \pm 0,08$ MP/individu et $0,02 \pm 0,02$ MP/g de chair humide (Tableau 11).

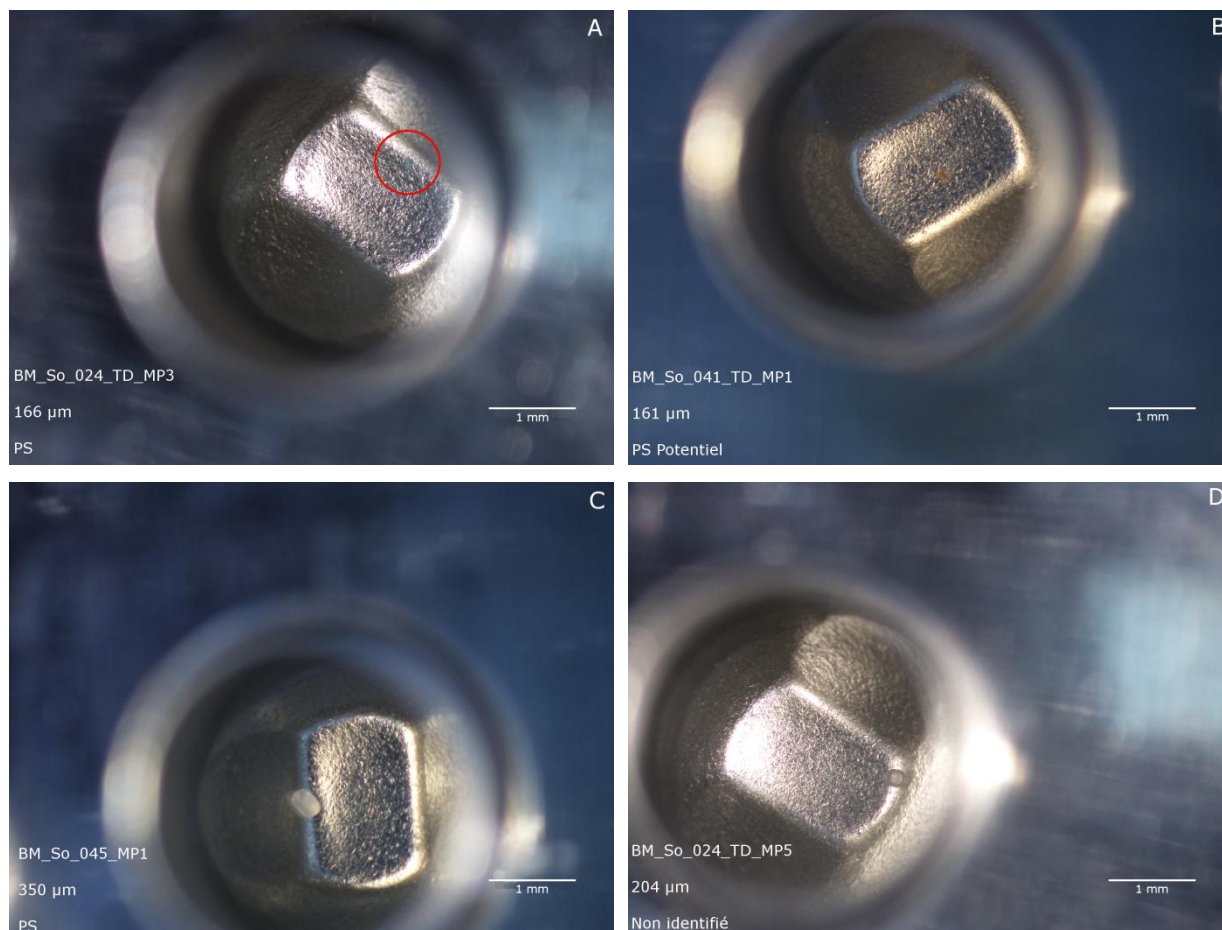


Figure 21 : Photographie des fragments identifiés comme du polystyrène (A & B), du polystyrène potentiel (C) et non identifié (D) provenant des tractus gastro-intestinaux des soles.

A ce jour, une seule étude a été réalisée sur la contamination des TGI de soles. Dans l'étude de [Pellini et al. \(2018\)](#), les auteurs ont échantillonné 533 soles au cours de deux campagnes réalisées en 2014 et 2015. Lors des campagnes de 2014 et 2015, $1,75 \pm 0,05$ et $1,64 \pm 0,01$ MP/individu ont été quantifiés, respectivement, avec plus de 80% des poissons échantillonnés avec au moins un MP ingéré ([Pellini et al., 2018](#)). Les niveaux de l'étude de [Pellini et al. \(2018\)](#) en mer Adriatique sont bien supérieurs à ceux trouvés dans les soles pêchées en Manche. En effet, la différence est de l'ordre d'un facteur 30 entre l'étude réalisée en mer Adriatique et la présente étude. L'étude de [Pellini et al. \(2018\)](#) a été réalisée en mer

Méditerranée, une zone fortement contaminée par les déchets plastiques et les MP (Collignon *et al.*, 2012). Pour d'autres espèces de poissons benthiques, la contamination des TGI par les MP était de $1,46 \pm 1,02$ MP/individu pour des plies (*Pleuronectes platessa*) échantillonnées en mer de Clyde (Welden *et al.*, 2018), de $1,58 \pm 0,8$ MP/individu pour des soles perdrich panachée (*Microchirus variegates*) échantillonnées en Manche (Lusher *et al.*, 2013) et de 0 MP/individu pour des limandes (*Limanda limanda*) échantillonnées en mer du Nord (Hermesen *et al.*, 2017) (cf. Chapitre 1 – Tableau 4). La sole vit près du fond et récupère sa nourriture dans les sédiments du fond marin. Comme la densité des MP a tendance à augmenter suite au biofouling et à la colonisation de bactéries à leurs surfaces, ceux-ci vont tendre à s'accumuler dans les fonds marins (Galloway *et al.*, 2017; Lagarde *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2015; Woodall *et al.*, 2014) pouvant conduire à de fortes contaminations de ces espèces. Cependant, à ce jour, aucune tendance globale n'a été mise en évidence concernant l'ingestion des MP en fonction de la position des espèces de poissons dans la colonne d'eau (Lusher *et al.*, 2013).

L'utilisation de la Py-GC/MS pour identifier les MP-like dans la présente étude permet de mettre en évidence des surestimations de la contamination sans l'utilisation de technique d'identification. Ici, seulement 2 fragments et un film sur 31 MP-like sont identifiés avec certitude comme du plastique et un 3^{ème} fragment est identifié comme un potentiel MP. L'identification chimique des particules retrouvées dans les TGI de poissons considérées comme des MP n'est pas réalisée dans toutes les études, comme par exemple dans les études de Nadal *et al.* (2016), de Bellas *et al.* (2016) et de Boerger *et al.* (2010). Ceci peut conduire à une surestimation de la contamination par les MP.

II.3.2.2 Contamination des filets

Pour les filets, des MP-like ont été retrouvés dans 100% des filets de soles, dans 86% des filets des maquereaux et 100% des filets de merlans avec un total pour les 3 espèces de 469 fibres et 344 fragments. Le niveau de contamination était de $2,76 \pm 0,63$, $3,04 \pm 0,61$ et $10,46 \pm 2,15$ MP/filets (Tableau 12) et $0,05 \pm 0,01$, $0,04 \pm 0,01$ et $0,14 \pm 0,03$ MP/g de chair humide de filet (Tableau 12) pour les maquereaux, les merlans et les soles, respectivement. La quantité retrouvée de MP-like, exprimée par filet ou par g de chair humide, dans les filets de soles est significativement plus importante que dans les filets de maquereaux et de merlans (Kruskal-Wallis post-hoc, $p < 0,05$ - Tableau 12). Les MP-like retrouvés dans les filets des 3 espèces sont de couleurs variées : noir, gris, blanc, bleu, orange, beige, rouge, rose, jaune, marron, violet, vert et transparent. Les couleurs les plus communément rencontrées sont le

gris pour les fibres, ceci pour les 3 espèces, et le bleu pour les fragments retrouvés dans les soles et les merlans et le rouge pour ceux retrouvés dans les filets de maquereaux.

Les fragments retrouvés après retranchement des blancs pour les filets des merlans et des maquereaux ont été passés en Py-GC/MS pour identification. Ceci n'a pas été possible pour les fragments des filets de soles suite à un problème avec les filtres. Suite au passage en Py-GC/MS, sur les 39 fragments retrouvés dans les filets de merlans, 38 ont pu être analysés. Sur ces 38 particules seulement 6 ont été identifiées avec certitude comme du plastique menant à une contamination aux MP de 12% pour les filets de merlans. Le niveau de contamination aux MP, *stricto sensu*, était donc de $0,12 \pm 0,09$ MP/individu et $0,001 \pm 0,001$ MP/g de chair humide (Tableau 12). Les polymères retrouvés dans les filets de merlans sont les suivants : PE, PS, uPVC et du Poly(vinyl butyral). Les MP trouvés dans les filets de merlans mesuraient entre 97 et 1766 μm . Concernant les filets de maquereaux, 52 particules ont été analysées par Py-GC/MS sur les 73 MP-like comptés dans les filets. Sur ces 52 MP-like, 10 ont été identifiés comme des plastiques et 5 ont été identifiés comme des potentiels polymères plastiques. La contamination était donc de $0,30 \pm 0,16$ MP/individu et $0,005 \pm 0,001$ MP/g de chair humide de filet (Tableau 12). Les polymères identifiés étaient les suivants : du caoutchouc, PE, PP et PMMA. Les polymères potentiels étaient des co-polymères de PE-PS ou du PS. La taille des plastiques était comprise entre 79 et 2 517 μm .

Tableau 12 : Contamination aux MP-like et aux MP des filets de soles, de merlans et de maquereaux échantillonnés en Manche et en mer du Nord. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'intervalle de confiance 95% et les lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha=5\%$ après tests de Kruskal-Wallis suivi de test post-hoc.

	Sole	Merlan	Maquereau
% d'individu contaminé par des MP-like	100%	100%	86%
MP-like/individu	$10,46 \pm 2,15^a$	$3,04 \pm 0,61^b$	$2,76 \pm 0,63^b$
MP-like/g de chair humide	$0,14 \pm 0,03^a$	$0,05 \pm 0,01^b$	$0,04 \pm 0,01^b$
% d'individu contaminé par des MP	n.r	12%	24%
MP/individu	n.r	$0,12 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,16$
MP/g de chair humide	n.r	$0,001 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$

n.r : non réalisé

Actuellement, peu d'études ont été entreprises pour quantifier la présence de MP dans les filets de poissons (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018) malgré le fait que ce soit cette partie du poisson qui est consommée par la majeure partie des consommateurs (FAO, 2016). Dans le présent travail, la contamination des filets aux MP-like est généralisée car l'occurrence est de 100% pour les soles et les merlans et de 86% pour les maquereaux. Les

deux études réalisées à ce jour sur ce sujet ont mis en évidence la présence de MP dans les filets de plusieurs espèces de poissons des côtes iraniennes (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018) avec une contamination moyenne entre 0,57 et 1,5 MP/g de filet ce qui est très supérieure aux niveaux rencontrés dans les 3 espèces étudiées (max : 0,14 MP-like/g de chair humide de filet). Néanmoins, lors de l'étude d'Akhbarizadeh *et al.* (2018), la contamination aéroportée n'a pas été prise en compte et aucune identification des particules retrouvées n'a été effectuée. De plus, dans l'étude d'Abbasi *et al.* (2018) même si les auteurs prennent en compte la potentielle contamination aéroportée et identifiaient la nature polymérique des particules retrouvées en SEM-EDS, il paraît peu probable que des particules mesurant plus de 10 µm passent la barrière intestinale pour se retrouver dans les muscles des poissons étudiés (Paul-Pont *et al.*, 2018). Dans le présent travail, d'importantes mesures pour prévenir les risques de contamination aéroportée ont été prises, entraînant des manipulations supplémentaires. La contamination retrouvée dans tous les témoins a été prise en compte de la manière la plus conservative (Hermesen *et al.*, 2017) en retranchant les blancs aux échantillons en tenant compte de la forme et de la couleur des particules. Néanmoins, il reste difficile d'écarter une possible contamination des filets des soles, maquereaux et merlans. En effet, la plus forte contamination aux MP-like a été retrouvée dans les filets de soles dont le temps de dissection a été bien supérieur par rapport aux deux autres espèces. L'utilisation d'enceinte protégée, comme les PSM, aurait pu permettre de diminuer la contamination aéroportée (Wesch *et al.*, 2017). À ce jour, la méthode utilisée dans cette étude ne permet pas d'avoir accès aux MP de taille <50 µm dû à l'observation sous loupe binoculaire et à la récupération manuelle pour placer les MP-like dans la cupule d'analyse pour Py-GC/MS. Il a récemment été mis en évidence que la quantité de MP augmente avec la diminution de la taille considérée (Phuong *et al.*, 2018a) mais ceci nécessite des techniques d'extractions et d'identifications efficaces qui malheureusement ne sont pas, à ce jour, applicables pour les filets et les TGI de poissons.

II.3.3 Contamination des poissons par les polluants organiques hydrophobes et les additifs plastiques

Les polluants organiques hydrophobes ainsi que les additifs plastiques ont été détectés dans tous les digestats des poissons (Figure 22).

Concernant les polluants organiques hydrophobes, les concentrations moyennes sont, pour les 3 espèces, toutes en dessous de 1 ng/g (Figure 22) et les concentrations moyennes toutes espèces confondues étaient comprises entre 0,1 et 0,8 ng/g pour les Hydrocarbures

Aromatiques Polycycliques (HAP), 0,002 et 0,02 ng/g pour les Pesticides Organochlorés (POC), et 0,27 à 0,45 ng/g pour les Polychlorobiphényles (PCB).

Les quantités d'HAP mesurées dans les 3 espèces de cette étude sont faibles en comparaison avec d'autres études (Ke *et al.*, 2017; Ohiozebau *et al.*, 2017). Pour les denrées alimentaires, le risque lié aux HAP via la consommation de produits de la pêche, incluant les poissons, est faible. En outre, il semble que ce soit plus les modes de cuisson ; au grill ou au barbecue qui participent l'exposition du consommateur aux HAP (Anses, 2010). Pour les PCB, le seuil réglementaire est fixé à 75 ng/g de poids frais pour les produits issus de la pêche (Cheve et Le Noc, 2018; European Commission, 2011). De fortes différences spatiales dans la contamination des produits de la mer, comme les poissons, les mollusques ou les crustacés sont attendues en fonction de leur proximité des zones historiquement contaminées comme l'estuaire de la Seine. Ceci est dû à la forte rémanence de certains congénères dans les sédiments (Anses, 2010), cependant ceci n'est pas observé dans notre échantillonnage. Les POC sont considérés par la Convention de Stockholm (Stockholm Convention, 2016) comme des Polluants Organiques Persistants (POP) du fait de leur toxicité et surtout de leur forte rémanence dans l'environnement. Ainsi, des pesticides interdits d'utilisation, ou dont l'utilisation est limitée depuis quelques années, sont encore régulièrement détectés dans l'environnement et les organismes marins. Il convient de noter tout de même que les concentrations en pesticides organochlorés dans la chair de mollusques bivalves et de poissons ont diminué considérablement au cours des trente dernières années (Anses, 2010). Dans l'étude présentée ici, les niveaux sont faibles, proches ou en dessous des limites de détection ou de quantification et le risque pour le consommateur vis-à-vis de ces polluants organiques hydrophobes est donc considéré comme négligeable.

Concernant les concentrations des additifs plastiques, celles-ci sont plus importantes que celles des polluants organiques hydrophobes (Figure 22). En effet, les concentrations moyennes de PBDE variaient de 0,67 à 5,70 ng/g et celles des phtalates de 10,8 à 490,7 ng/g. Pour les 3 espèces, les phtalates ont été détectés à de plus fortes concentrations que les PBDE et la sole présentait les plus fortes concentrations. Les niveaux de contamination de la sole sont proches de ceux retrouvés dans des poissons provenant d'un marché Hongkongais (200 à 1230 ng/g de poids frais) (Cheng *et al.*, 2013). Il convient de noter qu'il existe une forte hétérogénéité des résultats en fonction des différents pools de chair pour la sole.

En 2011, l'EFSA a réalisé un travail sur l'évaluation du risque lié aux PBDEs et a montré que la consommation de produits de la pêche est la source majoritaire de BDE-47 et BDE-100. Néanmoins, l'EFSA a estimé que l'exposition via la nourriture ne constitue pas un risque pour

la population générale pour les BDE-47, BDE-153 et BDE-209 mais que certaines classes d'âges peuvent être plus exposées que d'autres (European Food Safety Authority, 2012).

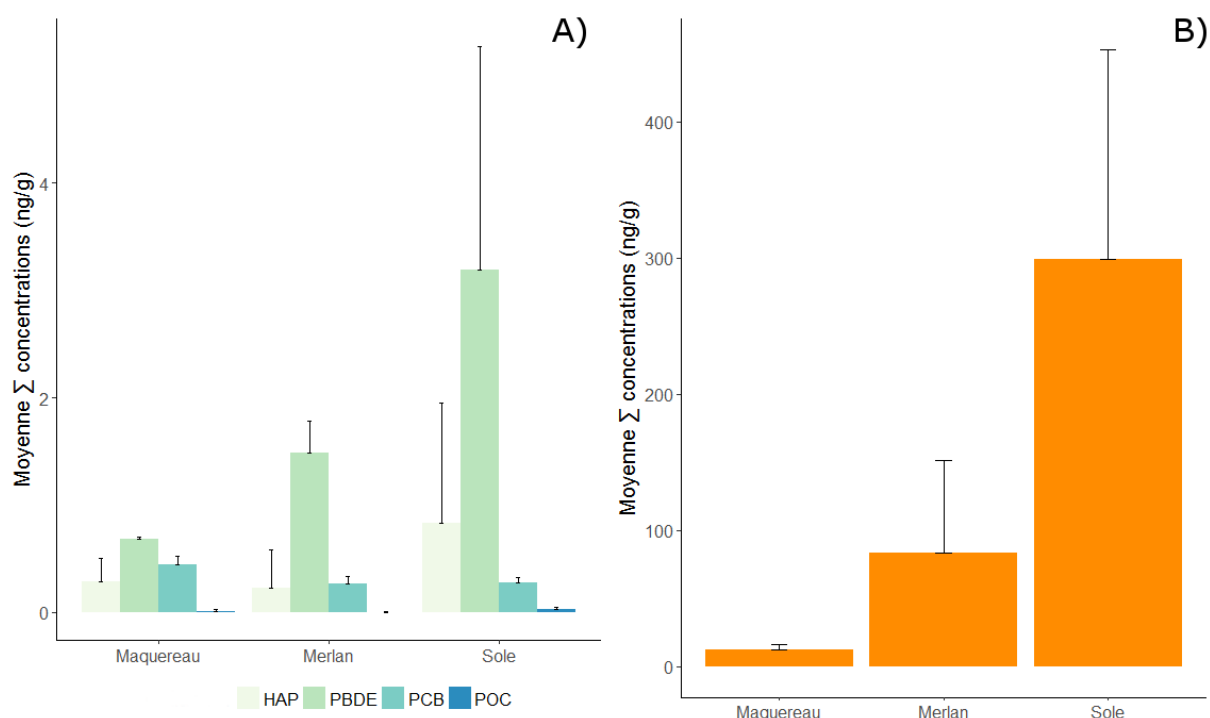


Figure 22 : Histogramme de la concentration moyenne (ng/g) ± l'intervalle de confiance à 95% en polluants. A) Σ_{HAP} , Σ_{PBDE} , Σ_{POC} , Σ_{PCB} et B) $\Sigma_{\text{Phthalate}}$ dans les filets de Maquereaux, Merlans et Soles échantillonnés en Manche et Mer du Nord. HAP : Hydrocarbone aromatique polycyclique ; PBDE : Polybromodiphényléther ; PCB : Polychlorobiphényle ; POC : Pesticide organochloré.

Aucune relation ($p\text{-value} > 0,05$) n'a été trouvée entre la concentration des polluants organiques hydrophobes et des additifs plastiques et la quantité de MP-like comptés ou MP identifiés dans les filets des trois espèces de poissons.

III Discussion du chapitre 3

Les objectifs de ce chapitre étaient de déterminer les niveaux de contaminations aux MP, aux HOC et aux additifs plastiques dans des produits de la pêche consommés par l'Homme. Dans ce travail, ont été considérées deux espèces de bivalves, généralement consommées entières et trois espèces de poissons dont seulement les filets sont consommés en France.

Pour les bivalves (**Article 5**), la moule *Mytilus edulis* et la coque *Cerastoderma edule*, échantillonnées le long des côtes de la Manche, la contamination aux MP est en accord avec d'autres études réalisées le long des côtes européennes (De Witte *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018c; Phuong *et al.*, 2018a; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Vandermeersch *et al.*, 2015a). La contamination des MP pour les moules était comprise entre $0,76 \pm 0,4$ et $0,78 \pm 0,3$ MP/individu et pour les coques, celle-ci était comprise entre $0,56 \pm 0,22$ et $2,46 \pm 1,16$ MP/individu. La contamination est plus faible lorsque ces données sont converties en MP/g de chair humide, avec entre $0,15 \pm 0,06$ et $0,25 \pm 0,16$ MP/g de chair humide pour les moules et entre $0,19 \pm 0,08$ et $0,74 \pm 0,35$ MP/g de chair humide pour les coques. Les polymères plastiques trouvés dans les coques et les moules étaient du PE, PP, PS, ABS, SBR, et du PET. De plus, les tailles des plastiques sont comprises entre 15 et 3 350 μm avec 31,7% $<50 \mu\text{m}$, 34,8% 50-100 μm , 32,6% 100-500 μm et 0,9% $>500 \mu\text{m}$. Ceci est en accord avec une étude récente réalisée le long des côtes atlantiques françaises trouvant que 84% des particules contaminant des moules et des huîtres ont des tailles $<100 \mu\text{m}$ (Phuong *et al.*, 2018a).

Pour les trois espèces de poissons, la sole *Solea solea*, le merlan *Merlangius merlangus* et le maquereau *Scomber scombrus*, la contamination des tissus incluant les TGI et les filets est faible en comparaison avec les études précédemment réalisées (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Hermsen *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2013; Pellini *et al.*, 2018; Welden *et al.*, 2018). Suite à de problèmes méthodologiques, seuls les TGI des soles ont pu être digérés puis filtrés et seules les particules retrouvées dans les filets de merlans et de maquereaux ont pu être analysées par Py-GC/MS. Après identification des particules suspectées d'être des plastiques, uniquement 8% des TGI de soles étaient contaminés avec en moyenne sur l'ensemble des individus, $0,08 \pm 0,08$ MP/individu et $0,02 \pm 0,02$ MP/g de chair humide. Pour les filets des merlans, 12% étaient contaminés par du plastique avec $0,12 \pm 0,09$ MP/individu et $0,001 \pm 0,001$ MP/g de chair humide alors que 24% des filets de maquereaux étaient contaminés par des MP. Sur l'ensemble des filets des maquereaux, la contamination

aux MP, *stricto sensu*, était de $0,30 \pm 0,16$ MP/individu et $0,005 \pm 0,001$ MP/g de chair humide de filet.

Ces deux études ont révélé l'importance de réaliser l'identification des particules ressemblantes à des MP afin d'estimer la contamination *stricto sensu* aux MP. En effet, les pourcentages d'identification des MP-like retrouvés dans les bivalves sont restés en dessous de 50% en moyenne (**Article 5**). De plus, les particules identifiées comme du plastique ne représentaient qu'entre 6 et 34% des particules analysées en spectroscopie μ -Raman. De la même manière, le nombre de MP-like trouvés dans les TGI des soles et les filets des merlans et des maquereaux était important. Néanmoins, après analyse par Py-GC/MS, les taux de contamination ainsi que le nombre d'individus contaminés ont fortement diminué.

A ce jour, un nombre important d'études a estimé la contamination aux MP pour plusieurs produits de la pêche sans réaliser d'identification des particules retrouvées (De Witte *et al.*, 2014; Lusher *et al.*, 2015b; Nadal *et al.*, 2016; Rochman *et al.*, 2015b). Du fait des différences importantes de contamination entre avant et après identification chimique présentées dans ce travail de thèse, il apparaît obligatoire de réaliser l'identification chimique (Raman, FTIR, Py-GC/MS) afin d'obtenir des données non biaisées, c'est-à-dire non surestimées.

A ce jour, peu d'études ont été réalisées afin de caractériser la contamination aux MP dans les parties consommables des poissons. Toutefois, des études ont été effectuées pour estimer la contamination aux MP dans des poissons consommés sous forme de conserves (sardine et sprat) (Karami *et al.*, 2018) et sous forme de poissons séchés éviscérés (Karami *et al.*, 2017a). Ces deux études ont montré que la présence de MP de taille $> 149 \mu\text{m}$ était assez faible dans ces produits (Karami *et al.*, 2017a; Karami *et al.*, 2018). Les autres études montrant la présence de MP dans des parties consommables de poissons (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018) présentent des problèmes analytiques et leurs résultats sont à considérer avec une grande précaution. La recherche de MP dans les filets de poissons doit permettre de répondre à une question de sécurité sanitaire : la consommation de poisson pose-t-elle un risque « microplastique » pour le consommateur ? Pour réaliser de telles études, il est indispensable de s'assurer qu'aucune contamination aéroportée des échantillons n'est possible et il faut utiliser une technique d'identification permettant d'accéder aux plus petites particules. De plus, avant d'effectuer ces études, il paraît nécessaire de caractériser le potentiel phénomène de translocation à travers la barrière intestinale des poissons pour une gamme de taille de MP allant de la centaine de nanomètre à la centaine de micromètre. Cette caractérisation permettra de connaître le rôle d'un tel phénomène dans la contamination potentielle des filets de poissons.

La contamination aux MP d'espèces de bivalves est bien plus documentée et comme l'Homme consomme ces produits entièrement, le danger lié aux MP est facilement calculable. Certains travaux sur les bivalves ont déjà estimé l'apport de MP via la consommation de ces espèces (Catarino *et al.*, 2018; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014).

Afin de mieux déterminer l'apport des MP pour l'Homme, il est nécessaire de comparer les différentes sources de ces micro-particules dans son alimentation. En effet, des produits autres que les produits de la pêche peuvent être source de MP dans le régime alimentaire humain. Des MP ont été détectés dans de l'eau de consommation en bouteille (Mason *et al.*, 2018; Oßmann *et al.*, 2018; Schymanski *et al.*, 2018), dans de la bière (Liebezeit et Liebezeit, 2014), du sel de table (Iñiguez *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017b; Yang *et al.*, 2015) et du miel (Liebezeit et Liebezeit, 2013). La consommation de chacun de ces aliments peut être source de MP pour l'Homme.

Les concentrations des polluants organiques hydrophobes ainsi que des additifs plastiques dans les tissus des bivalves et les filets des poissons sont en dessous des valeurs retrouvées dans la littérature pour d'autres espèces de produits de la pêche (Bellas *et al.*, 2014; Chiesa *et al.*, 2018; Ke *et al.*, 2017; Lacroix *et al.*, 2017; Ohiozebau *et al.*, 2017; Porte *et al.*, 2001). De plus, seulement les PCB sont réglementés pour la consommation de produits issus de la pêche et les échantillons, bivalves et filets de poissons de la présente étude, n'ont pas dépassé le seuil réglementaire de 75 ng/g de poids frais (European Commission, 2011). Par ailleurs, aucune relation n'a été mise en évidence entre la contamination aux MP dans les tissus des produits de la pêche et la concentration des polluants organiques hydrophobes ou des additifs plastiques, comme cela avait pu être observé dans d'autres études (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2016; Rochman *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2013).

Chapitre 4 Étude exploratoire de la lixiviation d'un additif plastique en condition digestive in vitro



I Lixiviation de l'irgafos 168 ®

I.1 Introduction

La plupart des additifs plastiques ne sont pas chimiquement mais physiquement liés à la matrice polymérique (Engler, 2012; Meeker *et al.*, 2009; Net *et al.*, 2015) et peuvent donc lixivier dans le milieu environnant. En plus des sources habituelles de ces additifs plastiques dans l'environnement marin, comme les eaux usées ou domestiques, les dépôts atmosphériques et le ruissellement, la présence de débris plastiques peut être une source supplémentaire. En effet, dans une étude récente, il a été démontré que des bouées en PSe, utilisées en aquaculture, sont la principale source d'un retardateur de flamme, l'hexabromocyclododécane (HBCD), dans les sédiments des baies de Masan et de Jinhae (Corée du Sud) (Al-Odaini *et al.*, 2015). Malgré cela, la lixiviation des additifs plastiques en conditions environnementales est assez peu documentée. A ce jour, seulement deux études ont examiné la lixiviation d'additifs plastiques en conditions environnementales ou en laboratoire (Rani *et al.*, 2017a; Suhrhoff et Scholz-Böttcher, 2016). Ces études ont montré que la lixiviation d'additifs plastiques est assez rapide avec la majorité du relargage ayant lieu dans les premières semaines d'exposition des plastiques au milieu environnant (Rani *et al.*, 2017a; Suhrhoff et Scholz-Böttcher, 2016).

Du fait de la contamination de l'environnement par les MP et de leur ingestion par les espèces marines, le transfert des additifs plastiques via l'ingestion de MP a été évalué dans quelques études. Il a été démontré que des moules vivant sur des bouées en PSe ingèrent des MP provenant des bouées et que ces moules sont plus fortement contaminées en HBCD en comparaison avec des moules vivant sur d'autres substrats (Jang *et al.*, 2016). De plus, il a été démontré que l'ingestion de MP par le puffin à bec grêle (*Puffinus tenuirostris*) favorise le transfert des PBDE, avec le congénère BDE-209 comme un marqueur de l'ingestion de plastiques (Tanaka *et al.*, 2013, 2015). De plus, Tanaka *et al.* (2015) ont démontré que la lixiviation des PBDE était accentuée par la présence d'huile stomacale d'oiseau.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'irgafos 168 ® (tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite) a été choisi pour réaliser une étude de lixiviation en condition stomacale in vitro. Cet additif plastique est utilisé dans le PP et le PE (Dopico-García *et al.*, 2007) et il a été détecté dans des emballages alimentaires (Cherif Lahimer *et al.*, 2017; Dopico-García *et al.*, 2007) et dans des aliments congelés (Tanaka *et al.*, 2003). Par ailleurs, un de ses produits de dégradation, le 2,4-di-tert-butylphenol a été retrouvé dans des plastiques collectés sur des plages coréennes (Rani *et al.*, 2017b; Rani *et al.*, 2015). De plus, l'irgafos

168[®] lixivie des emballages alimentaires au contact d'huile (Garde *et al.*, 1998; Marcato *et al.*, 2003) et sa forme oxydée, le tris(2,4-di-tert-butylphényl)phosphite, lixivie du PE placé dans de l'eau salée agitée (Suhrhoff et Scholz-Böttcher, 2016). La forme oxydée de l'irgafos 168[®] a des effets négatifs sur la croissance de cellules humaines en culture (Hammond *et al.*, 2013). Néanmoins, aucune étude n'a analysé la lixiviation de cet antioxydant en conditions digestives.

Les objectifs de ce travail étaient de (i) développer un modèle enzymatique in vitro de digestion pour les poissons (20°C) et l'homme (37°C) et (ii) d'étudier la lixiviation de l'irgafos 168[®] à l'aide des modèles préalablement développés.

I.2 Matériel et méthodes

I.2.1 Modèle enzymatique de digestion in vitro

Afin de représenter au mieux les conditions stomacales et intestinales de poissons et de l'homme, le modèle a été optimisé à des températures de 20°C et de 37°C pour les deux conditions respectives. De plus, les enzymes choisies : la pepsine et la trypsine sont les enzymes majoritaires de l'estomac et de l'intestin pour les deux modèles. Un cocktail enzymatique pancréatique, la pancréatine, composé de la trypsine, la lipase et l'amylase a aussi été utilisé. Une recherche bibliographique a été effectuée pour les activités spécifiques de ces quatre enzymes chez les poissons (Tableau 13). Pour le modèle humain, les activités de référence pour les quatre enzymes ont été trouvées dans une revue bibliographique sur la digestion des aliments in vitro (Minekus *et al.*, 2014) afin d'être le plus proche possible de l'existant.

Tableau 13 : Activités spécifiques (en U/mg de protéines) de la pepsine, la trypsine, l'amylase et la lipase chez des espèces de poissons marins.

Organe	Enzymes	Espèces	Activité spécifique (U/mg de protéines)	Réf
Estomac	Pepsine	<i>Scleropages formosus</i>	52.53 ± 5.96 (± S.D)	[1]
		<i>Chelon labrosus</i>	811.9 (max)	[4]
		<i>Thunnus orientalis</i>	41.3 ± 15.3 (± S.D)	[5]
		<i>Cebidichtys violaceus</i>	0.6392 ± 0.0487 (± S.E)	[6]
		<i>Xiphister mucosus</i>	0.6159 ± 0.0453 (± S.E)	[6]
		<i>Xiphister atropurpureus</i>	0.8703 ± 0.0621 (± S.E)	[6]
		<i>Anoplarchus purpureus</i>	0.6791 ± 0.1089 (± S.E)	[6]
Intestin	Trypsine	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.38 ± 1.8 (± S.D)	[8]
		<i>Scleropages formosus</i>	0.038 ± 0.001 (± S.D)	[1]
		<i>Sparidentex hasta</i>	3.0 ± 0.1 (± S.E)	[2]

	<i>Anarhichas lupus</i>	0.0641 – 0.0940	[9]
	<i>Symphysodon aequifasciata</i>	0.79 ± 0.05 (± S.D)	[10]
	<i>Thunnus orientalis</i>	0.3 ± 0.1 (± S.D)	[5]
	<i>Cebidichtys violaceus</i>	0.0021 ± 0.0003 (± S.E)	[6]
	<i>Xiphister mucosus</i>	0.0024 ± 0.0003 (± S.E)	[6]
	<i>Xiphister atropurpureus</i>	0.0018 ± 0.0002 (± S.E)	[6]
	<i>Anoplarchus purpureus</i>	0.0049 ± (± S.E)	[6]
	<i>Scleropages formosus</i>	0.73 ± 0.02 (± S.D)	[1]
	<i>Sparidentex hasta</i>	0.7 ± 0.0 (± S.E)	[2]
	<i>Epinephelus coioides</i>	1.4 ± 0.2 (± S.E)	[3]
	<i>Chelon labrosus</i>	32.9 (max)	[4]
	<i>Thunnus orientalis</i>	23.8 ± 6.8 (± S.D)	[5]
Amylase	<i>Cebidichtys violaceus</i>	0.0373 ± 0.0037 (± S.E)	[6]
	<i>Xiphister mucosus</i>	0.1158 ± 0.0172 (± S.E)	[6]
	<i>Xiphister atropurpureus</i>	0.1019 ± 0.0119 (± S.E)	[6]
	<i>Anoplarchus purpureus</i>	0.0258 ± 0.0056 (± S.E)	[6]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	129.24 ± 10.92 (± S.E)	[7]
	<i>Acipenser naccarii</i>	133.65 ± 22.08 (± S.E)	[7]
	<i>Scleropages formosus</i>	60.10 ± 5.40 (± S.D)	[1]
	<i>Sparidentex hasta</i>	0.9 ± 0.3 (± S.E)	[2]
	<i>Epinephelus coioides</i>	23.0 ± 1.0 (± S.E)	[3]
Lipase	<i>Chelon labrosus</i>	0.0214 (max)	[4]
	<i>Thunnus orientalis</i>	3.9 ± 1.1 (± S.D)	[5]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	47.95 ± 3.91 (± S.E)	[7]
	<i>Acipenser naccarii</i>	22.91 ± 3.47 (± S.E)	[7]

Moyennes exprimées ± écart-type (± S.D) ou ± l'erreur standard (± S.E).

Références : [1] Natalia *et al.* (2004) ; [2] Yaghoubi *et al.* (2016) ; [3] Wang *et al.* (2015); [4] Pujante *et al.* (2017) ; [5] de la Parra *et al.* (2007) ; [6] Chan *et al.* (2004) ; [7] Furné *et al.* (2005) ; [8] Wald *et al.* (2016) ; [9] Desrosiers *et al.* (2008) ; [10] Chong *et al.* (2002)

L'optimisation du modèle enzymatique a été réalisée afin de respecter les valeurs d'activités spécifiques de poissons retrouvées dans la littérature et pour obtenir des activités enzymatiques volumiques du même ordre de grandeur que celles décrites par le modèle humain de Minekus *et al.* (2014).

1.2.2 Lixiviation de l'irgafos 168 ®

1.2.2.1 Protocole expérimental pour l'étude de la lixiviation de l'irgafos 168 ®

Pour chaque condition expérimentale, les enzymes sont dissoutes dans 100 mL de tampons adéquats selon le Tableau 14. Les enzymes utilisées sont des enzymes commerciales : pepsine de porc 500 U/mg (Sigma-Aldrich, référence : 77160, St-Quentin-

Fallavier, France), trypsine de porc 1000-2000 BAEE/mg (Sigma-Aldrich, référence : T4799, St-Quentin-Fallavier, France) et pancréatine provenant de pancréas de porc (Sigma-Aldrich, référence : P1750, St-Quentin-Fallavier, France). En complément, des témoins sans enzyme et une condition eau de mer (EDM) artificielle ont été réalisés à 20°C.

Les microplastiques utilisés lors de ces expérimentations étaient des microparticules, synthétisées en laboratoire (Institut des Molécules et Matériaux du Mans), de PE additivées d'irgafos 168 ® à 2% (masse/masse) (PE-Irg). La taille de ces particules était comprise entre 20 et 100 µm avec une taille moyenne de 28 µm. Pour chaque analyse, la quantité choisie de ces microparticules de PE-Irg était de 5 particules/mL de tampon en référence à des données environnementales (Lenz *et al.*, 2016). L'incubation a été réalisée dans une enceinte thermostatée (SANYO, Osaka, Japon) sous agitation à 150 rpm (plaque à agitation magnétique, 2mag MIXDrive 6 HT, Munich, Allemagne). Les températures de l'enceinte thermostatée ont été réglées à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et $37 \pm 1^\circ\text{C}$ dans les solutions pour mimer, respectivement, les conditions naturelles chez le poisson et l'Homme. L'incubation a duré 8h afin de respecter le temps moyen de transit chez les poissons (Grove *et al.*, 1978; Olsson *et al.*, 1999) et l'homme avec une cinétique de prélèvement à 0, 2, 4 et 8h d'incubation avec 3 réplicats par temps d'incubation. A chaque temps de prélèvement et pour chaque répétition, 1,5 mL de la solution enzymatique ont été prélevés afin de réaliser les dosages enzymatiques et conservés dans un tube Eppendorf. Le restant de la solution a été filtré sur filtre GF/A (porosité 1,6 µm, Whatman, Velizy-Villacoublay, France). Le filtre ainsi que le filtrat ont ensuite été conservés au congélateur à -20°C pour le dosage de l'irgafos 168 ®.

Tableau 14 : Conditions expérimentales d'incubation des solutions enzymatiques.

Conditions expérimentales	Enzyme	Tampon	pH	Température d'incubation (en °C)
Estomac	Pepsine	50 mM tampon phosphate-citrate	3	20
				37
Intestin	Trypsine	50 mM Tris-HCl ajout de 20 mM CaCl ₂	7,2	20
				37
Cocktail	Pancréatine	50 mM Tris-HCl ajout de 20 mM CaCl ₂ , 0,25 mM 2-méthoxyéthanol, 5 mM sodium cholate	7,2	20
				37
Témoin – Estomac	-	50 mM tampon phosphate-citrate	3	20
				37
Témoin – Intestin	-	50 mM Tris-HCl ajout de 20 mM CaCl ₂	7,2	20
				37
Témoin – Cocktail	-	50 mM Tris-HCl ajout de 20 mM CaCl ₂ , 0,25 mM 2-méthoxyéthanol, 5 mM sodium cholate	7,2	20
				37
Témoin – Eau de mer artificielle	-	-	7,8	20

1.2.2.2 Dosage des activités enzymatiques

1.2.2.2.1 Dosage des protéines

Le dosage des protéines présentes, dans les différentes enzymes, a été réalisé d'après la méthode de [Bradford \(1976\)](#). Dans un premier temps, une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) à 1 mg/mL est préparée afin de réaliser une gamme étalon (Tableau 15) à l'aide du réactif de Bradford (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Chaque point de la gamme est réalisé en triplicat.

Tableau 15 : Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines des enzymes d'après la méthode de Bradford (1976).

Volume de BSA à 1mg/mL (en µL)	0	2,5	5	10	20	40	60	80
Volume de H₂O (en µL)	100	97,5	95	90	80	60	40	20
Quantité de BSA (µg)	0	2,5	5	10	20	40	60	80
Réactif de Bradford (en mL)	2	2	2	2	2	2	2	2

La gamme étalon est incubée à température ambiante pendant 5 min avant de mesurer l'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre (Jenway 6505 UV/VIS, Staffordshire, Royaume-Uni). La gamme d'étalonnage polynomiale d'ordre deux $A_{595} = f(\text{quantité de BSA})$ est tracée et est validée si le coefficient de régression $R^2 \geq 0,99$.

1.2.2.2.2 Dosage de l'activité de la pepsine

Le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine est réalisé d'après la méthode de [Worthington \(1993\)](#). Dans un premier temps, une solution d'acide chlorhydrique 0,06 N est préparée à partir d'une solution d'HCl à 1 N (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France). Ensuite, une solution d'hémoglobine (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) à 2% est préparée dans l'HCl 0,06 N. Et, pour finir, une solution d'acide trichloroacétique (ATC) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) à 5% est préparée dans de l'eau bi-distillée. Les incubations à 37°C sont réalisées dans un bain marie (Julabo TW 12, Seelbach, Allemagne). Les échantillons pour le dosage de l'activité de la pepsine sont préparés dans des tubes Eppendorf d'après le Tableau 16.

Tableau 16 : Préparation des échantillons et des blancs pour le dosage de l'activité de la pepsine d'après la méthode [Worthington \(1993\)](#).

Produits	Echantillon	Blanc
Substrat Hémoglobine	500 µL	500 µL
	5 min à 37°C	
Enzyme	100 µL	0 µL
	10 min à 37°C	
ATC 5%	1000 µL	1000 µL
	0 µL	100 µL
	5 min à 37°C	

Une fois la dernière incubation réalisée, les échantillons sont centrifugés (Thermoscientific Multifuge X3R centrifuge, Villebon sur Yvette, France) à 4000 g pendant 6 min à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Jenway 6505 UV/VIS, Staffordshire, Royaume-Uni) à $\lambda=280$ nm. L'activité enzymatique (en

U/mL) de la pepsine se calcule d'après l'équation 1 puis est divisée par la concentration en protéines de l'échantillon pour obtenir la valeur en U/mg de protéines :

$$(1) \text{Activité volumique de la pepsine (en U/mL)} \\ = \frac{(\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc}) \times df \times 1000}{10 \times V}$$

Avec df le facteur de dilution (1/3 si dilution au tier, par exemple), $1000 = 1/0.001$ dû au changement d'absorbance à 280 nm par unité de pepsine, 10 temps d'incubation (en min) et V volume d'enzyme utilisée, ici 0,1 mL.

1.2.2.2.3 Dosage de l'activité de la trypsine

L'activité de la trypsine a été dosée d'après la méthode de [Holm et al. \(1988\)](#). Dans un premier, un tampon Tris-HCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) et Chlorure de calcium (CaCl_2) 20 mM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) est préparé et ajusté à un pH de 8,2. Ensuite, le substrat de N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (L-BAPNA) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) est préparé à 0,1 M dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France). Le L-BAPNA est spécifiquement catalysé par la trypsine libérant la p-nitroaniline (coloration jaune) qui est détecté à $\lambda=407$ nm. Les microcuves, contenant du tampon Tris-HCl - CaCl_2 , utilisées pour réaliser la mesure de l'absorbance, sont incubées à 25°C à l'aide d'un bain marie (Amersham Bioscience Multitemp III, Little Chalfont, Royaume-Uni). Après incubation, 10 μL de substrat et 100 μl d'échantillon sont ajoutés au tampon puis l'absorbance est mesurée pendant 2 min à $\lambda=407$ nm à l'aide du mode cinétique du spectrophotomètre (Jenway 6505 UV/VIS, Staffordshire, Royaume-Uni). L'activité enzymatique en U/mL est calculée à l'aide de l'équation 2 puis est divisée par la concentration en protéines de l'échantillon pour obtenir la valeur en U/mg de protéines :

$$(2) \text{Activité volumique de la trypsine (en U/mL)} = \frac{\Delta DO/min}{\varepsilon \times l} \times \frac{TV}{SV} \times d$$

avec ΔAbs la variation d'absorbance sur 2 min dû à la réaction entraînant un changement de couleur de la solution, ε le coefficient d'extinction millimolaire du substrat à 407 nm soit 8,2 L/mmol/cm, l la longueur de la cuve, TV le volume total de la réaction, SV le volume de l'échantillon et d la dilution effectuée.

1.2.2.2.4 Dosage de l'activité de la lipase

Le dosage de l'activité de la lipase a été réalisée d'après la méthode d'[Iijima et al. \(1998\)](#). La mesure repose sur le suivi par spectrophotométrie de l'apparition du chromophore

jaune paranitrophénol (pNP), produit de l'hydrolyse du p-nitrophényl myristate sous l'action de la lipase. Dans un premier temps, une solution tampon contenant le substrat de Tris-HCl 0,25 M (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France), 2-méthoxyéthanol 0,25 mM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France), p-nitrophenyl myristate 0,53 mM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) et de sodium cholate 5 mM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) est préparée et le pH est ajusté à 9. Dans un second temps, une solution d'arrêt d'acétone (VWR, Fontenay-sous-bois, France)/heptane (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) (5v/2v) est préparée. Dans un Eppendorf de 2 mL, 500 µL de la solution tampon contenant le substrat ainsi que 10 µL d'échantillon sont mis à incuber à 30°C au bain-marie (Julabo TW 12, Seelbach, Allemagne) pendant 15 min. Pendant ce temps, un blanc est préparé et consiste en 500 µL de tampon substrat, 10 µL d'échantillon et 700 µL de solution d'arrêt. Après l'incubation, 700 µL de solution d'arrêt sont ajoutés dans les Eppendorfs contenant les échantillons. Les tubes sont ensuite centrifugés à 6080 g pendant 2 min à 4°C (Thermoscientific Multifuge X3R centrifuge, Villebon sur Yvette, France). La phase aqueuse jaune est prélevée et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à $\lambda=405$ nm (Jenway 6505 UV/VIS, Staffordshire, Royaume-Uni). L'activité de la lipase est calculée en U/mL à l'aide de l'équation 3 puis est divisée par la concentration en protéines de l'échantillon pour obtenir la valeur en U/mg de protéines :

(3) *Activité volumique de la lipase (en U/mL)*

$$= \frac{(Abs\ échantillon - Abs\ blanc) \times TV \times d}{16,5 \times t \times SV}$$

avec 16,5 le coefficient d'extinction millimolaire du p-nitrophenyl myristate dans les conditions de l'essai, *TV* le volume total de la réaction en mL, *SV* le volume de l'échantillon en mL et *d* la dilution de l'échantillon.

1.2.2.2.5 *Dosage de l'activité de l'amylase*

Le dosage de l'activité de l'amylase a été réalisée en utilisant la méthode de [Métais et Bieth \(1968\)](#). Dans un premier temps, il est nécessaire de préparer une solution de tampon phosphate (NaH₂PO₄ - Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) à une concentration de 0,067 M. Ensuite, il faut préparer une solution de substrat d'amidon à 0,3% (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) avec la solution de tampon phosphate. Pour cela, il faut dissoudre l'amidon dans le phosphate et faire chauffer la solution 5 min au bain marie à 100°C (Heidolph, Schwabach, Allemagne). Une solution d'iode 0,003 N à partir d'une solution à 0,1 N (Merck, Darmstadt, Allemagne) est préparée. Les incubations à 37°C sont

réalisées dans un bain marie (Julabo TW 12, Seelbach, Allemagne). Les échantillons sont à préparer comme indiqué dans le Tableau 17. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à $\lambda=580$ nm (Jenway 6505 UV/VIS, Staffordshire, Royaume-Uni)

Tableau 17 : Préparation des échantillons et des blancs pour le dosage de l'activité de l'amylase d'après la méthode de Métais et Bieth (1968)

Produits	Échantillon	Blanc
Échantillon à doser	50 μ L	0 μ L
Substrat	200 μ L	200 μ L
Incuber au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes		
HCl 1N	20 μ L	20 μ L
Échantillon à doser	0 μ L	50 μ L
Eau MilliQ	400 μ L	400 μ L
Iode N/3000	2 mL	2 mL

L'activité de l'amylase est calculée en U/mL à l'aide de l'équation 4 puis est divisée par la concentration en protéines de l'échantillon pour obtenir la valeur en U/mg de protéines :

$$(4) \text{ Activité volumique de la lipase (en U/mL)} \\ = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ blanc})}{DO \text{ blanc}} \times Q \times C \times d$$

avec Q la quantité d'amidon en mg de l'essai, C le coefficient rapportant le volume d'échantillon à 1 et d la dilution de l'échantillon.

1.2.2.3 Quantification de l'irgafos 168® dans les échantillons

1.2.2.3.1 Extraction de l'irgafos 168® des filtres

L'extraction de l'irgafos 168® des filtres est adaptée de la méthode de [Camacho et Karlsson \(2000\)](#). Les filtres contenant les PE-Irg sont placés dans des ballons avec 8 mL d'un mélange (50/50) d'acétone (Carlo-Erba, Val-de-Reuil, France) et d'hexane (VWR, Fontenay-sous-bois, France). 100 μ L d'étalon interne, le phtalate de benzyle et de butyle (BBP) à 1 μ g/mL sont ajoutés. Le tout est mis à chauffer à reflux pendant 1h afin de dissoudre les particules plastiques. Après l'étape de chauffage à reflux, les échantillons sont placés au réfrigérateur à 4°C pendant la nuit. Le contenu du ballon est ensuite transvasé dans des tubes à centrifugation puis rincé avec 2 mL d'acétone/hexane (50/50). Les tubes sont centrifugés à 2000 rpm pendant 8 min à 6°C (Awel MF-48-R, Blain, France). Le surnageant est récupéré et mis à évaporer. L'évaporation est réalisée à 60°C sous agitation à 200 rpm (Buchi Syncore,

Rungis, France) jusqu'à un volume de 200 µL mesuré à l'aide d'un réservoir mesurant ce volume. L'échantillon a alors été transféré dans un vial puis conservé au réfrigérateur à 4°C en attente de l'analyse en GC-MS/MS.

1.2.2.3.2 Extraction de l'irgafos 168 ® des filtrats

Les filtrats sont décongelés environ 2h avant extraction. Une fois décongelé, le filtrat est placé dans une ampoule à décanter et 10 µL d'étalon interne, BBP, y sont ajoutés. 10 mL de dichlorométhane (VWR, Fontenay-sous-bois, France) sont ajoutés dans la bouteille et celle-ci est agitée puis son contenu est transvasé dans l'ampoule à décanter contenant le filtrat. L'ampoule à décanter est agitée puis laissée sur son support pour décantation. La phase inférieure est ensuite « passée » sur du sulfate de sodium (Carlo-Erba, Val-de-Reuil, France) puis récupérée. L'opération de rinçage au dichlorométhane a été répétée au total 3 fois. Les échantillons ont ensuite été mis à évaporer (Buchi Syncore, Rungis, France) à 60°C avec une agitation de 200 rpm jusqu'à un volume de 200 µL. L'échantillon a alors été transféré dans un vial puis conservé au réfrigérateur à 4°C en attente de l'analyse en GC-MS/MS.

En plus des filtrats des expériences, des témoins négatifs de tampons ont été réalisés. Ces témoins sont les tampons seuls sans enzymes et sans PE-Irg. L'extraction a été réalisée de la même manière que pour les filtrats des expériences.

1.2.2.3.3 Analyse de l'irgafos 168 ® en GC-MS/MS

Avant de réaliser la quantification de l'irgafos 168 ® en GC-MS/MS, il est nécessaire de préparer une gamme d'étalonnage qui permettra de le quantifier. Pour cela, de l'irgafos 168 ® sous forme réduite (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) et oxydée (Toronto Research Chemicals, North York, Canada) a été utilisé. Les gammes d'irgafos 168 ®, réduit et oxydé, sont préparées séparément. Les concentrations des deux formes d'irgafos 168 ® vont de 0 à 1 ng/mL et la gamme étalon est préparée comme suit : 90 mL d'eau Evian ®, 10 mL de méthanol, 10 µl d'étalon interne, BBP, à 1 µg/mL et le volume adéquat de différentes solutions mères d'irgafos 168 ® sous forme réduite ou oxydée (S0 : 10 µg/mL, S1 : 1µg/mL, S2 : 100 ng/mL et S4 : 10 ng/mL) (Tableau 18). Ici, la gamme étalon est préparée dans de l'eau d'Evian ® car celle-ci présente peu d'interférences avec l'analyse de l'irgafos 168 ®. Les extractions sont ensuite réalisées de la même manière que pour les échantillons.

Tableau 18 : Récapitulatif pour la préparation de la gamme d'irgafos 168 oxydé et réduit en vue du dosage par GC-MS/MS.

[irgafos 168] (en ng/mL)	V _{solution irgafos} (en µL)	V _{BBP} (µL)	V _{methanol} (en mL)	V _{eau} (en mL)
1	10 (S0)			
0,5	50 (S1)			
0,25	25 (S1)			
0,1	10 (S1)	10 µL de la solution à 1µg/mL	10	90
0,05	50 (S2)			
0,01	10 (S2)			
0,005	50 (S3)			
0	0			

La quantification de l'irgafos 168 ® est réalisée à l'aide d'une GC Agilent 7890A couplée à une MS/MS Agilent 7000 (Agilent Technologies, Little Falls, USA) et équipée d'une unité de thermodésorption (TDU) couplée à un système d'injection à froid (CIS) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Pour chaque analyse, 10 µL de l'échantillon ou des points de gammes sont déposés sur des tubes de désorption. Les tubes de désorption sont alors placés dans le TDU qui est alors chauffé de 50 à 280°C à 115°C/min puis maintenu pendant 6 min afin de thermodésorber les analytes qui ont ensuite été cryoconcentrés dans le CIS à -10°C. L'injection dans le système GC-MS/MS a été réalisée en mode splitless et le CIS a été chauffé jusqu'à 300°C à 12°C/s. La séparation est effectuée sur une colonne HP-5MS (30 m, 0.25 mm, 25 µm d'épaisseur) (Agilent, Little Falls, USA). Le programme du four GC est le suivant : 50°C pendant 2 min puis augmentation jusqu'à 300°C à 20°C min maintenue 10 min. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 2 mL/min.

La détermination de la limite de détection (LOD) est calculée d'après la méthode des courbes de calibration de [Shrivastava et Gupta \(2011\)](#). La limite de détection (LOD) de la méthode a été calculée en divisant la LOQ par trois.

1.2.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (v3.4.0) ([R Core Team, 2015](#)) en utilisant l'interface RStudio (v0.99.903).

L'effet du temps (8h d'incubation) sur l'activité des enzymes a été testé à l'aide d'ANOVA à 1 facteur. En amont des ANOVA, la normalité des données ainsi que l'homoscédasticité ont été vérifiées. Si l'ANOVA était significative, des tests post-hoc du HSD (honest significant difference) de Tukey ont été réalisés à l'aide du package agricolae ([De Mendiburu, 2014](#)). En cas de non-respect de l'une des conditions d'application, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. De plus, des tests post-hoc de Nemeysi ont

été effectués à l'aide du package PMCMR (Pohlert et Pohlert, 2018) si des différences significatives étaient observées après le test de Kruskal-Wallis.

Pour les filtres, l'effet du temps d'incubation sur la concentration en irgafos 168 ® oxydée a été testé avec un test-T de Student après vérification de la normalité des données et de l'égalité des variances. Si les variances ne sont pas égales, la correction de Welch est appliquée et si la normalité n'est pas respectée, un test non paramétrique de Mann-Whitney est effectué.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (S.D). Le seuil de significativité considéré est $\alpha=5\%$.

I.3 Résultats

I.3.1 Vérification préliminaire de l'activité des enzymes utilisées pour l'étude de lixiviation

Les activités des deux enzymes purifiées ainsi que les activités des trois enzymes composant le mélange pancréatique ont été dosées à chaque temps de prélèvement (Figure 23).

Pour le modèle poisson à 20°C (Figure 23A), les activités enzymatiques spécifiques de l'amylase et de la trypsine dans la pancréatine ne sont pas significativement différentes au cours du temps. Néanmoins pour les activités spécifiques de la pepsine, de la trypsine et de la lipase dans la pancréatine, des différences significatives ont été observées au cours du temps. Pour la pepsine, une différence significative (HSD Tukey, $p<0,05$) a été observée en 0 et 4h d'incubation ainsi qu'entre 2 et 4h, montrant une légère augmentation de l'activité enzymatique spécifique de cette enzyme sur cette période. Pour la trypsine, des différences significatives d'activité enzymatique spécifique (HSD Tukey, $p<0,05$) ont été mises en évidence entre 0 et 2h, 0 et 4h et 4 et 8h d'incubation montrant une légère augmentation (d'un facteur 1,2) de l'activité enzymatique entre 0 et 4h d'incubation puis une légère diminution de l'activité enzymatique spécifique de l'enzyme entre 4 et 8h.

Pour la lipase dans la pancréatine, une différence significative d'activité enzymatique spécifique a été constatée entre 0 et 8h d'incubation (Kruskal-Wallis post-hoc, $p<0,05$) montrant une diminution de l'activité de cette enzyme au cours des 8h d'incubation.

Pour le modèle humain, c'est-à-dire avec une température d'incubation à 37°C (Figure 23B), les activités enzymatiques volumiques de l'amylase et de la trypsine ne sont pas significativement différentes au cours du temps. Pour la pepsine, une différence significative a été observée entre 0 et 2h (HSD Tukey, $p<0,05$) montrant une diminution de cette activité

volumique puis une stabilisation ensuite. Pour la lipase dans la pancréatine, des différences significatives d'activité volumique (HSD Tukey, $p < 0,05$) ont été observées entre tous les temps d'incubations montrant une diminution au cours du temps de l'activité de cette enzyme dans la pancréatine jusqu'à un niveau proche de zéro. Pour la trypsine dans la pancréatine, l'activité enzymatique volumique diminue significativement à partir de 4h d'incubation pour finir au plus bas au bout de 8h d'incubation (HSD Tukey, $p < 0,05$ - Figure 23B).

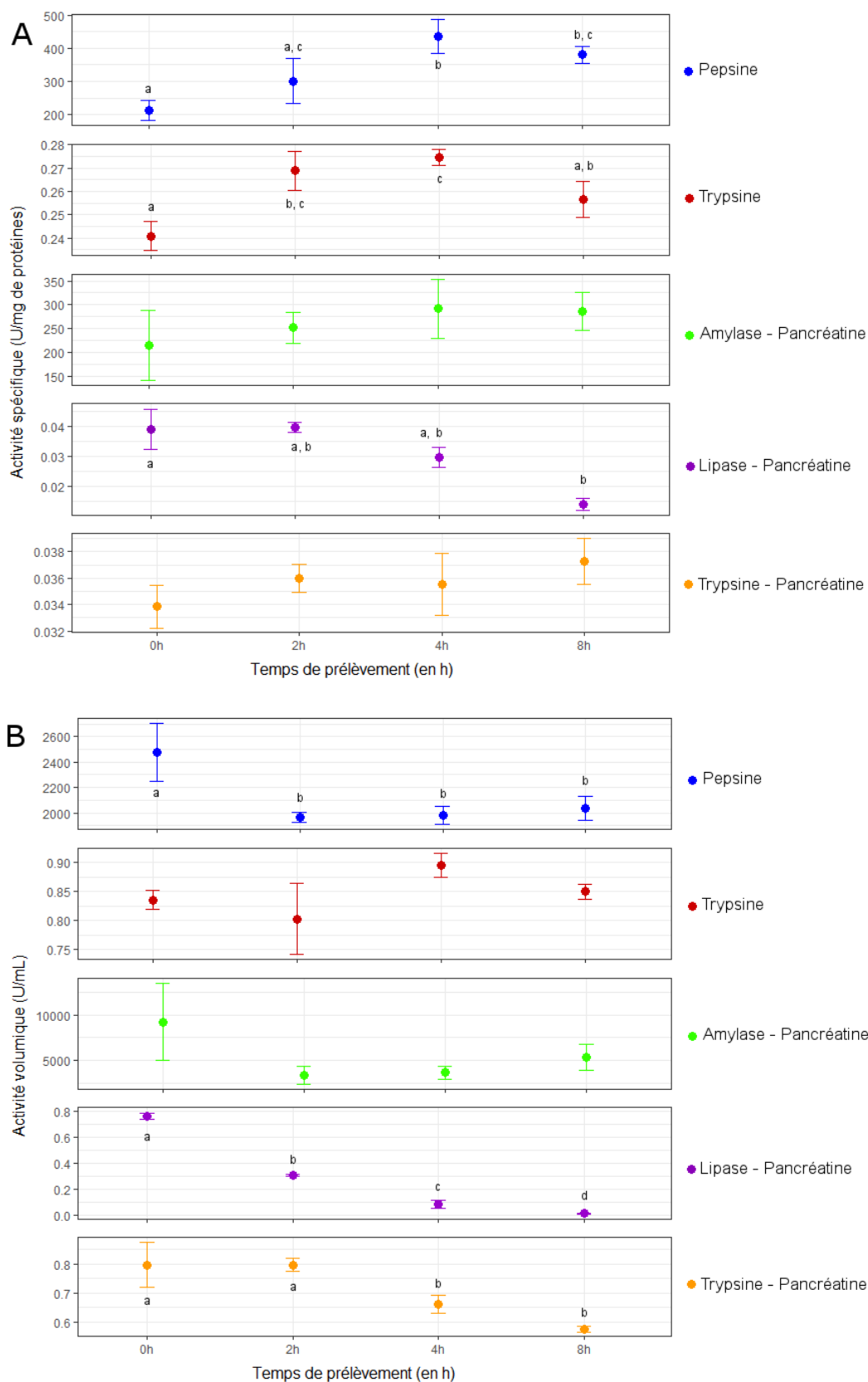


Figure 23 : Activités spécifiques (en U/mg de protéines) moyennes des enzymes incubées à 20°C (A) et activités volumiques (en U/mL de solution) moyennes des enzymes incubées à 37°C (B), au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type (n=3). Deux points identifiés par deux lettres différentes matérialisent l'existence d'une différence significative au seuil de 5% d'erreur (HSD Tukey).

La comparaison des activités spécifiques pour le modèle poisson à 20°C et des activités volumiques pour le modèle humain à 37°C avec les données bibliographiques sont présentées respectivement dans le Tableau 19 et le Tableau 20. Concernant les activités spécifiques pour le modèle poisson à 20°C (Tableau 19), les concentrations choisies permettent d'obtenir des activités enzymatiques pour la pepsine et trypsine qui se trouvent en cohérence avec celles trouvées dans la bibliographie. Pour les enzymes du mélange pancréatique, les activités de la lipase et de la trypsine sont dans les limites inférieures des activités spécifiques trouvées dans la bibliographie (Tableau 13). Ce n'est en revanche pas le cas pour l'amylase dans la pancréatine. En effet, l'amylase est l'enzyme la plus active du mélange pancréatique et la diminution de son activité n'a pas été possible car cela aurait aussi diminué les activités des deux autres enzymes.

Tableau 19 : Gamme (minimum – maximum) des activités spécifiques (U/mg de protéines) mesurées et trouvées dans la littérature pour les différentes enzymes considérées

Enzymes	Activité spécifique mesurée (U/mg de protéine)	Activité spécifique de la littérature (U/mg de protéine)
Pepsine	191 - 491	0,38 – 811,9
Trypsine	0,233 – 0,278	0,0018 – 3,0
Pancréatine : <i>Lipase</i>	0,0119 – 0,0433	0,0214 – 60,10
<i>Amylase</i>	137 - 461	0,0062 – 133,65
<i>Pancréatine</i>	0,032 – 0,039	0,0018 – 3,0

Pour le modèle humain à 37°C (Tableau 20), les activités volumiques de la pepsine, de la trypsine purifiée et de la trypsine contenue dans la pancréatine sont dans la gamme des activités volumiques de la revue utilisée (Minekus *et al.*, 2014).

Que ce soit pour le modèle poisson à 20°C ou le modèle humain à 37°C, les enzymes sont restées actives pendant les 8h d'incubation avec des profils d'activités différents selon les enzymes. De plus, à l'exception de l'amylase dans la pancréatine à 20°C, toutes les enzymes avaient des activités similaires à celles retrouvées dans la bibliographie (Tableau 13). Les deux modèles enzymatiques in vitro ont donc été utilisés pour des expérimentations évaluant la lixiviation de l'irgafos 168 ® incorporé dans des MP de PE.

Tableau 20 : Gamme (minimum – maximum) des activités volumiques (U/mL de solution) mesurées et trouvées dans la littérature (Minekus *et al.*, 2014) pour les différentes enzymes considérées. Ici pour la pancréatine, seule la valeur de la trypsine est reportée car elle sert de valeur de référence pour le mélange pancréatique.

Enzymes	Activité volumique mesurée (U/mL de solution)	Activité volumique de la littérature (U/mL de solution)
Pepsine	1907 - 2687	2000
Trypsine	0,738 – 0,919	0,845
Pancréatine :		
<i>Lipase</i>	-	-
<i>Amylase</i>	-	-
<i>Pancréatine</i>	0,563 – 0,871	0,845

I.3.2 Lixiviation de l'irgafos 168 ® en conditions digestives in vitro

A ce jour, les extractions ont seulement été réalisées pour les filtres 0 et 8h ainsi que pour les filtrats obtenus après 8h d'incubation.

I.3.2.1 Dosage de l'irgafos 168 ® dans les filtres

Premièrement, lors des dosages de l'irgafos 168 ® dans les filtres ou les filtrats, seule la forme oxydée a été détectée. La LOD et la LOQ de la méthode sont respectivement de 2,13 et 7,09 ng/g.

Concernant la concentration de l'irgafos 168 ® sous forme oxydée dans les filtres aux deux températures d'incubation, les concentrations étaient comprises, en moyenne, entre 82 et 880 ng/filtre au temps initial (0h) et entre 81 et 980 ng/filtre au bout de 8h d'incubation (Figure 24). Globalement pour le modèle poisson (20°C) (Figure 24A), les concentrations en irgafos 168 ® oxydé varient fortement d'une condition à une autre et même pour une même condition. La seule différence significative (Test T, $p < 0,05$) entre les deux temps d'incubations sur les filtres (avec Pe-Irg) a été trouvée pour la condition cocktail enzymatique représentée par la pancréatine (Figure 24A) ; avec une concentration de l'irgafos 168 ® oxydé plus importante après 8h d'incubation. Pour le modèle humain, la seule différence significative entre les deux temps d'incubation a été détectée pour le témoin de la condition estomac (sans enzyme) avec une concentration moins importante au bout de 8h d'incubation (Test T, $p < 0,05$) (Figure 24B). La même variabilité inter- et intra- conditions a été observée pour la concentration de l'irgafos 168 ® oxydé quantifiée dans les filtres du modèle poisson (Figure 24A) et du modèle humain (Figure 24B).

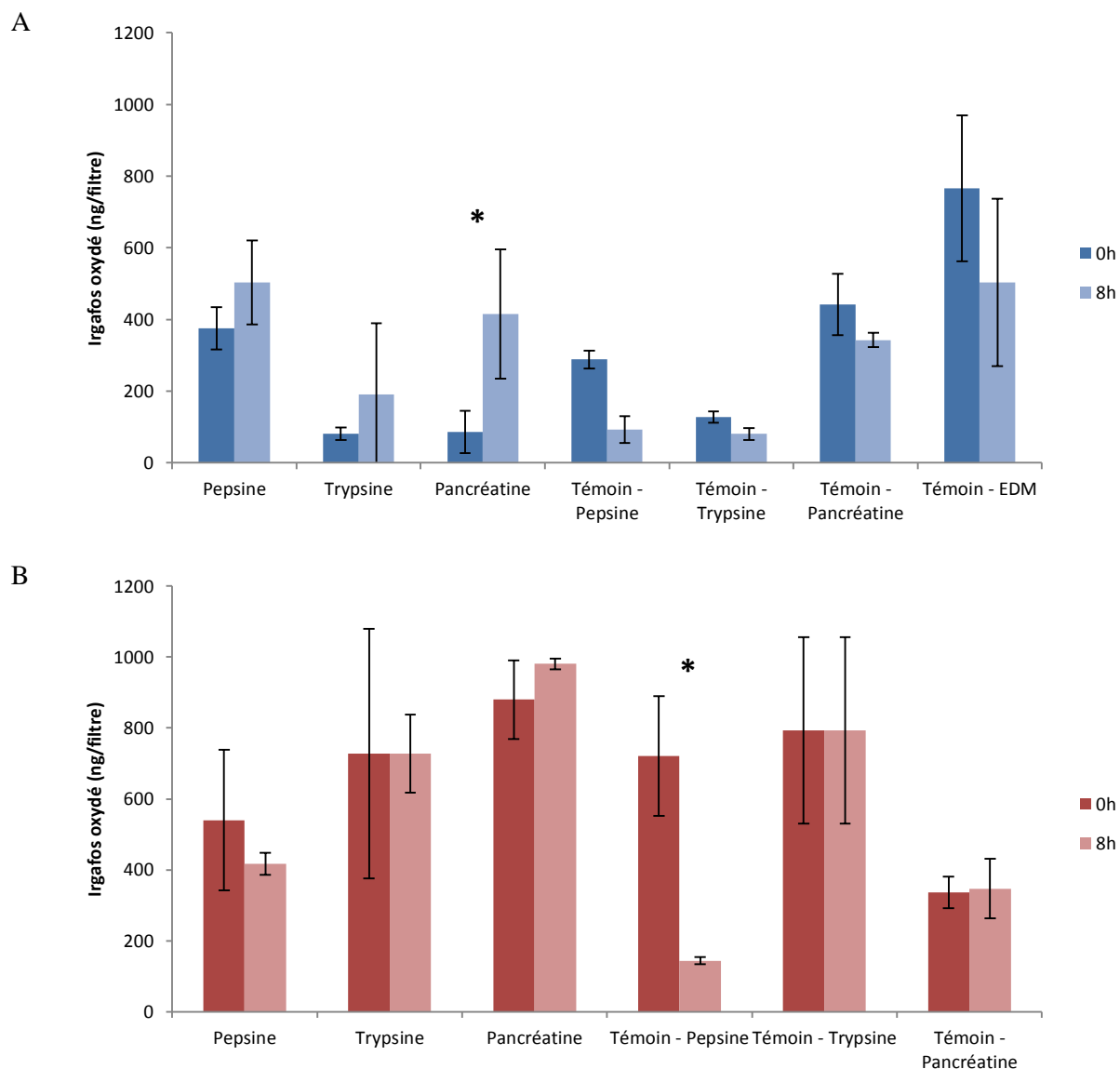


Figure 24 : Concentrations moyennes (\pm S.D) de l'irgafos 168 (en ng/filtre) sous sa forme oxydée dans les filtres obtenues après incubation de 0 et 8h pour le modèle poisson à 20°C (A) et le modèle humain à 37°C (B). * : différence significative au cours du temps (entre 0 et 8h) de la concentration de l'irgafos 168 oxydé (Test T, $p < 0,05$). EDM : Eau de mer artificielle.

I.3.2.2 Dosage de l'irgafos 168® dans les filtrats

Concernant la concentration de l'irgafos 168® sous forme oxydée dans les filtrats après 8h d'incubation, les concentrations étaient comprises, en moyenne, entre 101 et 459 ng/filtre à 20°C et entre 19 et 386 ng/filtre à 37°C (Figure 25). Pour les deux modèles, globalement, la concentration en irgafos 168® oxydé dans les filtrats est moins importante que dans les filtres (Figure 25). Pour le modèle poisson à 20°C, aucune différence significative n'a été observée entre la concentration d'irgafos 168® oxydé dans le filtre et le filtrat, et ceci pour toutes les conditions d'incubations (Figure 25A). Pour le modèle humain, aucune différence significative n'a été détectée entre la concentration d'irgafos 168® oxydé dans le filtre et le

filtrat pour les conditions Témoin Trypsine et Témoin Pancréatine (Figure 25B). Néanmoins pour les autres conditions du modèle humain, des différences significatives entre la concentration d'irgafos 168® oxydé dans le filtre et le filtrat ont été observées (Test T, $p < 0,05$ - Figure 25B). Pour les conditions représentant l'estomac (Pepsine), l'intestin (Trypsine) et le cocktail enzymatique (Pancréatine), la concentration en irgafos 168® oxydé est, significativement, plus importante dans le filtre que dans le filtrat (Figure 25B). A l'inverse, la concentration d'irgafos 168® oxydé est, significativement, moins importante dans le filtre que dans le filtrat pour le Témoin Pepsine (Figure 25B).

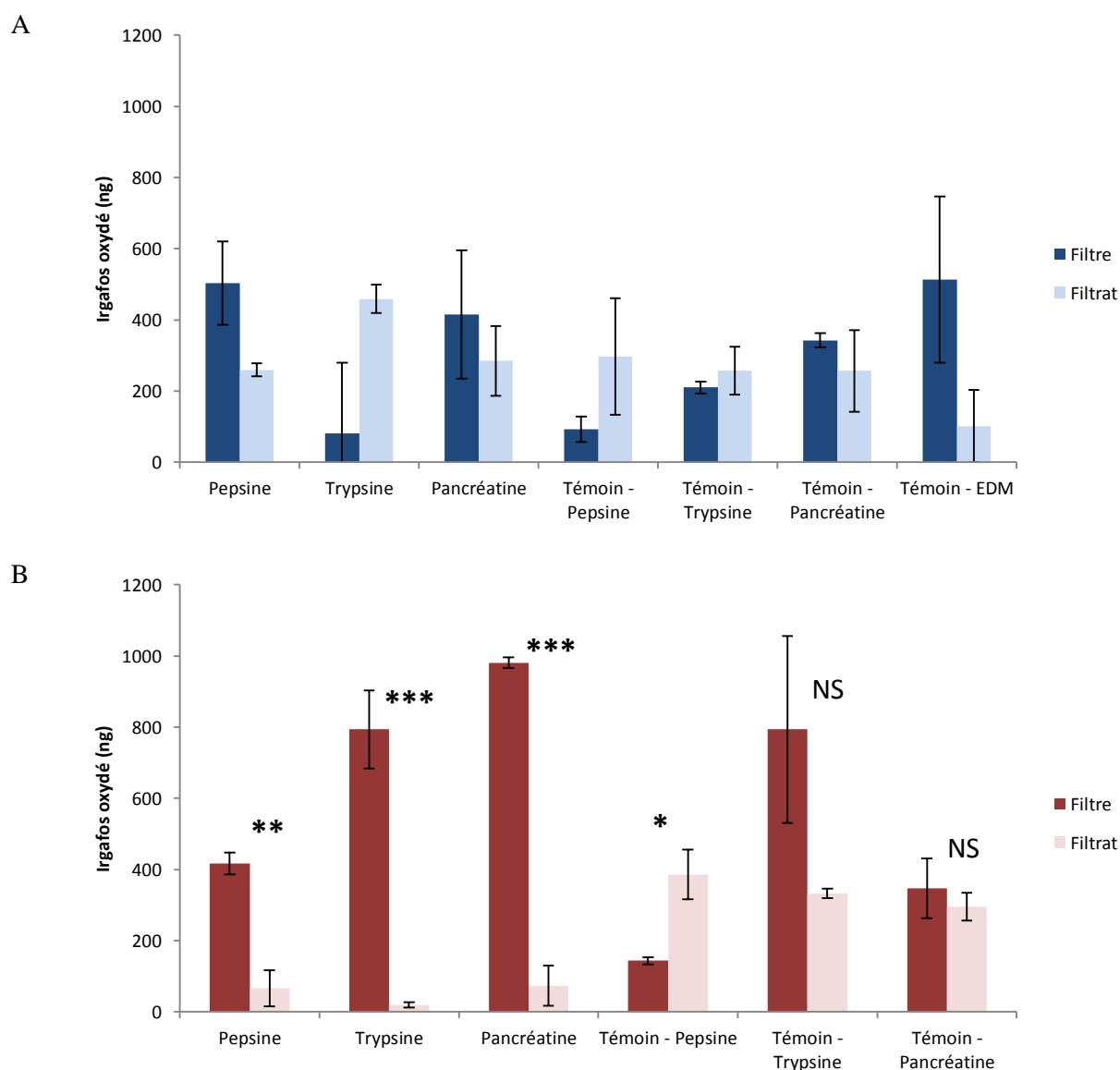


Figure 25 : Concentrations moyennes (\pm S.D) de l'irgafos 168 (en ng) sous sa forme oxydé dans les filtrats et dans les filtres (en ng/filtre) obtenues après incubation de 8h pour le modèle poisson à 20°C (A) et le modèle humain à 37°C (B). Les étoiles correspondent à un niveau de différences significatives entre les deux matrices de dosages de la concentration de l'irgafos 168 oxydé (Test T). NS : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. EDM : Eau de mer artificielle.

Toutefois, malgré la présence d'irgafos 168 ® dans les filtrats de toutes les conditions des deux modèles enzymatique in vitro, il est difficile de conclure quant à l'influence de conditions digestives sur la lixiviation de l'antioxydant hors des particules de PE.

De plus, lors du dosage de l'irgafos 168 ® dans des témoins négatifs, des tampons (tampons seul sans enzyme et sans MP), celui-ci a été détecté. En effet, 80 ± 78 (\pm S.D), 134 ± 25 ng et 150 ± 15 ng d'irgafos 168 ® oxydé ont été quantifiés dans les tampons des conditions expérimentales estomac, intestion et cocktail respectivement.

I.4 Discussion

Les objectifs de cette partie étaient (i) de développer deux modèles enzymatiques in vitro mimant les conditions digestives du poisson (20°C) et de l'homme (37°C) et (ii) d'étudier la lixivation de l'iragfos 168 ® de particules de PE à l'aide de ce modèle enzymatique de manière exploratoire.

Les deux modèles enzymatiques in vitro développés dans ce travail respectaient les données de la littérature quant aux activités spécifiques et volumiques des enzymes utilisées. En effet, pour le modèle poisson, à l'exception de l'amylase, les activités spécifiques dosées pour la pepsine, la trypsine, la lipase et la trypsine dans la pancréatine sont comprises dans la gamme des activités spécifiques trouvées dans la littérature (Tableau 13 et Tableau 19). A ce jour, aucun modèle enzymatique in vitro digestif n'existe pour les espèces de poisson et le modèle présenté ici est le premier. De plus, pour le modèle humain, les activités volumiques des enzymes utilisées sont du même ordre de grandeur que les activités volumiques (Tableau 20) du modèle in vitro consensus de digestion des aliments (Minekus *et al.*, 2014), qui a servi ici de référence. Néanmoins, les deux modèles développés ici sont assez simples car ce sont des modèles statiques composés simplement d'enzymes digestives incubées dans un tampon sous agitation. Afin de complexifier les modèles, ceux-ci pourraient être adaptés avec des modèles dynamiques de digestion in vitro. Ces derniers prennent en compte les forces mécaniques et les processus biochimiques (flux d'enzymes, acidification, sécrétions...) qui se déroulent dans le tractus digestif (Ménard et Dupont, 2014). L'utilisation de modèles dynamiques permettrait de se rapprocher encore plus de la réalité des conditions digestives, en tout cas pour le modèle humain car aucun modèle dynamique n'existe pour le poisson. Ces deux modèles enzymatiques in vitro pourraient donc être appliqués dans d'autres études sur, notamment, le devenir des MP dans le système digestif des poissons ou de l'Homme.

Lors des dosages par GC-MS/MS de l'irgafos 168 ®, celui-ci a seulement été détecté sous sa forme oxydée (tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate) et jamais sous sa forme réduite

(tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite). Le phénomène de dégradation (Figure 26) de la forme réduite vers la forme oxydée est un phénomène courant pour cette molécule (Fouyer *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016) permettant ainsi de protéger le plastique (Fouyer *et al.*, 2012). Lors des études de lixiviation de l'irgafos 168 ® des emballages alimentaires, les deux formes sont couramment recherchées (Dopico-García *et al.*, 2007; El Mansouri *et al.*, 1998; Suhrhoff et Scholz-Böttcher, 2016; Yang *et al.*, 2016).

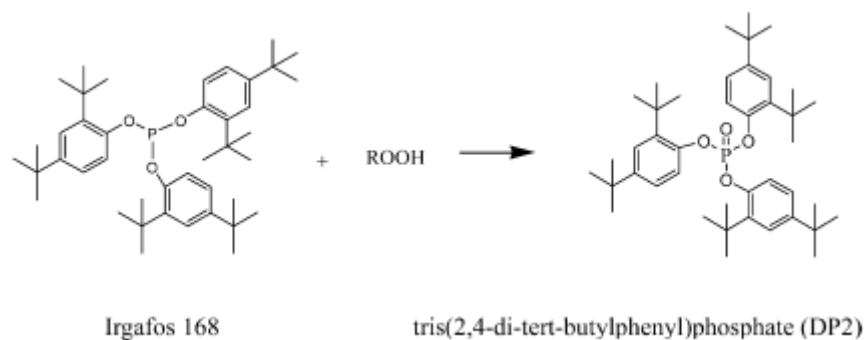


Figure 26 : Oxydation de l'irgafos 168 ® (tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite) sous forme réduite en sa formé oxydée tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate. D'après Yang *et al.* (2016).

D'après Yang *et al.* (2016), l'oxydation de la forme réduite en forme oxydée peut avoir lieu à plusieurs moments : lors de l'extrusion du polymère, pendant le stockage à l'obscurité, lors d'une exposition au soleil ou lors d'une exposition aux UV. Cette dernière est la voie d'oxydation la plus rapide (Yang *et al.*, 2016). Lors de dosage de l'irgafos 168 ® directement dans le plastique dopé (PE-Irg), celui-ci a été retrouvé sous les deux formes. Cela n'a pas été le cas après les extractions de l'irgafos 168 ® des filtres et des filtrats. Il est possible que l'oxydation ait eu lieu soit pendant l'incubation dans les tampons soit pendant les processus analytiques (extractions ou dosage en GC-MS-MS).

Les concentrations, dans les filtres et les filtrats, d'irgafos 168 ® oxydé étaient très variables entre les conditions et même en intra-condition. Cette forte variabilité de la quantité d'irgafos oxydé retrouvée peut-être due à plusieurs facteurs : une non homogénéité de la répartition de l'irgafos dans le PE lors de sa fabrication et donc une variabilité de sa concentration dans les particules utilisées, des différences de concentration de MP placés dans les différents réplicats résultants en une différence de quantité d'irgafos initiale dans les réplicats ou des phénomènes ou des cinétiques de lixiviation très différents d'un réplikat à un autre. Par conséquent, cette expérimentation n'a pas permis d'évaluer l'impact des conditions digestives sur le phénomène de lixiviation. En perspective, comme dans certaines conditions la concentration en irgafos 168 ® était plus plus importante que la quantité initialement introduite et que cet antioxydant a été retrouvé dans des tampons négatifs, il a été

décidé d'étudier les potentielles sources de contamination à l'irgafos 168[®] dans les présentes expérimentations.

II Détection de l'irgafos 168[®] dans les emballages et les produits chimiques utilisés dans l'étude de lixiviation

II.1 Introduction

Suite aux difficultés d'interprétation des résultats de lixiviation à cause de l'importante variabilité des données et à la contamination des témoins négatifs, par de l'irgafos 168[®], une étude de détection des potentielles sources de l'irgafos 168[®] a été entreprise. Cette étude a eu pour objectif de rechercher l'irgafos 168[®] sous ces deux formes dans les produits chimiques et leurs emballages utilisés précédemment dans le protocole de lixiviation.

II.2 Matériel et méthodes

Afin de connaître la provenance de la contamination de nos échantillons et des solutions tampons, des analyses en Py-GC/MS ont été réalisées. Pour cela, environ 1 mg (Sartorius, CP224S, Dourdan, France) des différents emballages des produits chimiques a été découpé (Tableau 21). En plus, des emballages, l'irgafos 168[®] sous ses deux formes a aussi été recherché dans les produits chimiques. Comme pour les emballages, les poudres de produits chimiques ont été pesées (Sartorius, CP224S, Dourdan, France) pour obtenir environ 1 mg. La liste des produits chimiques testés est présentée dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Liste des produits chimiques utilisés pour la recherche d'irgafos 168[®] sous ses formes réduite et oxydée dans les emballages et dans les poudres.

Produits	Utilisé pour	Recherche dans emballage	Recherche dans poudre
PE-Irg	Microplastique		X
Acide citrique	Tampon pepsine	X	X
Na ₂ HPO ₄	Tampon pepsine	X	X
Sodium cholate	Tampon pancréatine	X	X
CaCl ₂	Tampon pancréatine	X	X
Tris-HCl	Tampon trypsine		
	Tampon pancréatine		X
Pepsine	Tampon trypsine		
	Enzyme	X	X
Trypsine	Enzyme	X	X
Pancréatine	Enzyme	X	X

L'échantillon d'emballage ou de poudre est placé dans une cupule d'analyse (Frontier-Lab, Fukushima, Japan). Dans le cas des poudres, un capuchon en fibre de quartz (Whatman,

Velizy-Villacoublay, France) a été ajouté par-dessus afin d'éviter toute perte de poudre pendant l'analyse. Les cupules contenant les produits à analyser ont été placées sur un passeur d'échantillon automatique AS-1020E d'un pyrolyseur EGA/PY-3030D (Frontier-Lab, Fukushima, Japan). Les échantillons ont été pyrolysés à 700°C pendant 1 min puis injectés dans une GC-2010 (Shimadzu, Noisiel, France) avec un split ratio de 5. La séparation des produits de pyrolyse a été réalisée sur une colonne Rxi-5ms (60 m, 0.25 mm, 25 µm d'épaisseur) (Restek, Lisses, France). La température de la ligne de transfert entre le pyrolyseur et la GC est fixée à 300°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur et la vitesse linéaire est réglée à 40 cm/s. Le programme de température du four GC a été réglé de la manière suivante : 40°C pendant 2 min puis augmentation de la température jusqu'à 320°C à 20°C/min puis maintenue pendant 20 min. Le spectre de masse a été obtenu avec une MS QP2010-Plus. La température d'interface entre la GC et la MS a été fixée à 300°C, celle de la source d'ions à 200°C et le voltage de l'ionisation a été réglé à 70 eV. Les spectres de masse ont été acquis en mode SIM en ciblant les m/z caractéristiques de l'irgafos 168[®] réduit (441 et 147) et oxydé (316, 647, 648 et 663).

Les aires des pics ont été intégrées afin de pouvoir calculer de manière proportionnelle, la contribution de chaque produit chimique dans l'apport de la pollution à l'iragos 168[®].

II.3 Résultats

Afin de rechercher l'irgafos 168[®] dans les emballages des produits chimiques, des fragments ainsi que les poudres ont été soumis à la Py-GC/MS. Un exemple d'un pyrogramme obtenu après pyrolyse de fragments de PE-Irg est présenté en Figure 27.

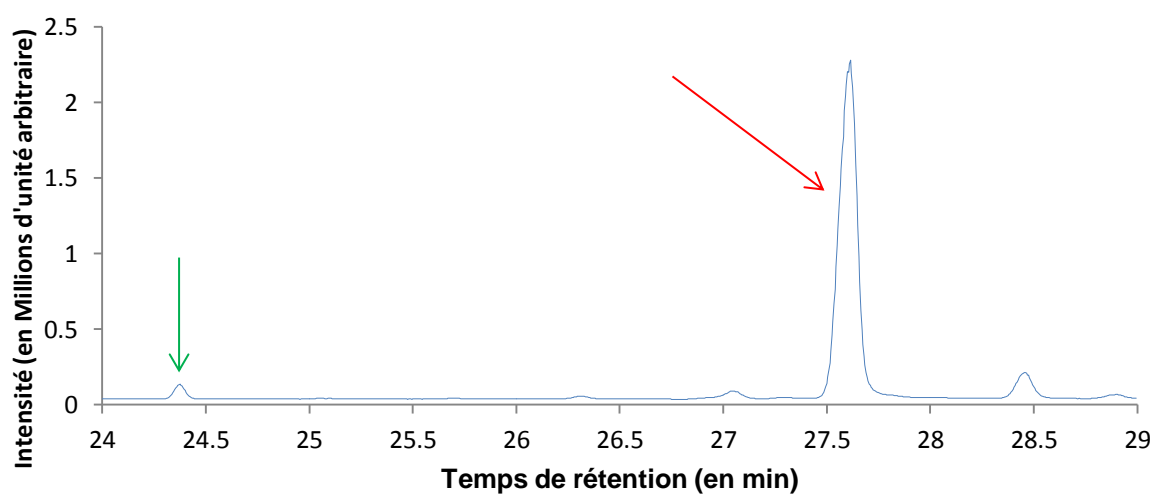


Figure 27 : Pyrogramme obtenu après Py-GC/MS de particules de PE-Irg. La flèche verte indique l'irgafos 168[®] sous sa forme réduite et la flèche rouge sous sa forme oxydée.

L'irgafos 168[®] sous forme réduite ou oxydée a été détecté dans plusieurs emballages de produits chimiques utilisés lors de la préparation des tampons enzymatiques et même dans la poudre de ces produits (Tableau 22). La contamination retrouvée dans les témoins négatifs de l'étude de lixiviation peut donc provenir de différentes sources.

Tableau 22 : Récapitulatif de la présence de l'irgafos 168[®] sous ses formes réduite et oxydée dans les emballages et dans les poudres.

Produits	Utilisé pour	Irgafos 168 détecté dans l'emballage		Irgafos 168 détecté dans la poudre	
		Réduit	Oxydé	Réduit	Oxydé
Acide citrique	Tampon pepsine	Oui	Oui	Non	Oui
Na ₂ HPO ₄	Tampon pepsine	Oui	Oui	Non	Non
Sodium cholate	Tampon pancréatine	Non	Non	n.r	n.r
CaCl ₂	Tampon pancréatine	Oui	Oui	Non	Non
	Tampon trypsine				
Tris-HCl	Tampon pancréatine	n.r	n.r	Non	Oui
	Tampon trypsine				
Pepsine	Enzyme	Oui	Oui	Non	Oui
Trypsine	Enzyme	Non	Oui	Non	Oui
Pancréatine	Enzyme	Non	Oui	Non	Oui

n.r : Non réalisé

Lorsque l'irgafos 168[®] sous forme oxydé a été détecté dans une poudre de produit chimique, l'apport de ce produit chimique à la quantité d'irgafos 168[®] oxydé trouvée dans les solutions a été calculé. Ces calculs ont été réalisés pour chaque condition expérimentale correspondant à un volume final de 100 mL de tampon. Pour les enzymes, la quantité d'irgafos 168[®] oxydé variait entre 37 et 248 µg par condition en fonction de la température d'incubation. Pour la trypsine et la pancréatine, les quantités étaient comprises entre 37 et 61 µg et 51 et 248 µg par condition, respectivement à 20 et 37°C. Pour la pepsine, aux deux températures la quantité d'irgafos 168[®] oxydé était de 50 µg par condition. Pour les produits chimiques ayant été utilisés pour l'élaboration des tampons, la quantité d'irgafos 168[®] oxydé était de 265 µg par condition pour le Tris-HCl et de 87 µg par condition pour l'acide citrique. De plus, dans 100 mL de tampon, l'eau bi-distillée est à l'origine de l'apport de $2,3 \cdot 10^{-5}$ µg d'irgafos 168[®] oxydé par condition. Il apparaît que l'apport des différents produits chimiques, utilisé lors de la préparation des tampons, et des enzymes est bien supérieur à ce qu'il a été précédemment quantifié (section I.3). En effet, la concentration moyenne la plus importante retrouvée était de 0,98 µg d'irgafos 168[®] oxydé par filtre pour les conditions du cocktail enzymatique (pancréatine) incubé 8h à 37°C (section I.3).

II.4 Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer les potentielles sources de contamination en irgafos 168[®] provenant du mode opératoire de l'étude de la lixiviation.

Malgré l'utilisation de matériel de laboratoire principalement composé de verre, il semble que la contamination à l'irgafos 168[®] ait été assez commune. En effet, la présence d'irgafos 168[®] sous ses formes réduite et oxydé dans un grand nombre d'emballage et de poudre de produits chimiques (Tableau 22) pourrait expliquer la contamination des témoins négatifs des tampons utilisés pour incuber les enzymes. Les emballages des produits chimiques étaient tous en PEBD et comme l'irgafos 168[®] est un antioxydant principalement utilisé dans les polyoléfines, c'est-à-dire principalement le PE et le PP, la présence de ce produit dans les emballages ne paraît pas surprenante. Les calculs semi-quantitatifs de proportionnalité ont révélé que la contribution des produits chimiques et des enzymes dans la concentration de l'irgafos 168[®] oxydé dépassait, potentiellement, les quantités dosées dans les filtres et les filtrats. La quantité introduite d'irgafos 168[®] par condition à l'aide des MP de PE-Irg est très négligeable (50 ng) en comparaison avec la quantité due aux différents produits chimiques incluant les enzymes (de l'ordre de la dizaine-centaine de µg). Il y a donc bien eu une contribution des produits chimiques utilisés dans les expérimentations sans que la part de cette contribution puisse être déterminée correctement.

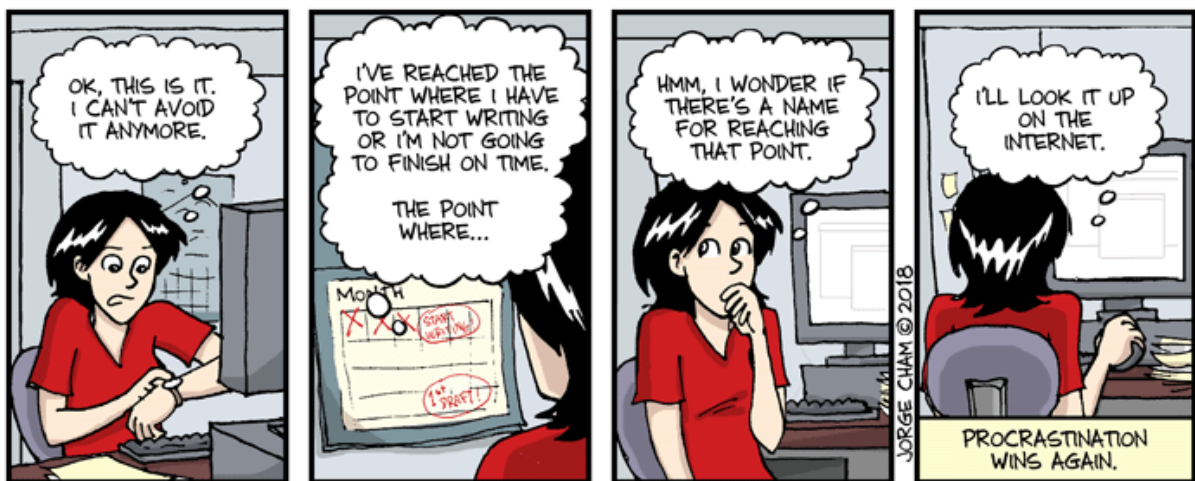
Dans cette étude la concentration en PE-Irg utilisée était très faible (5 MP/mL). Même si cette concentration en MP est plus réaliste d'un point de vue environnemental ([Lenz et al., 2016](#)), l'utilisation d'une concentration plus importante aurait pu augmenter la concentration en irgafos 168[®] dans les différentes conditions et ainsi, la contamination due au mode opératoire se serait trouvée dans le bruit de fond analytique. Globalement dans la présente étude, les conditions utilisées étaient, volontairement, proches de celles trouvées dans l'environnement, afin d'obtenir des résultats de lixiviation les plus fidèles possibles de ce qui pourraient être observés chez le poisson ou chez l'homme.

Contrairement aux emballages en contact avec les aliments qui sont soumis à réglementation ([European Commission, 2014](#)), les emballages plastiques non alimentaires ne sont pas soumis à réglementation et la migration des additifs plastiques dans les produits contenus n'est pas étudiée. Afin d'évaluer le danger global pour le consommateur lié à ces additifs plastiques, il serait intéressant de réaliser des études de migration dans les différents emballages même non alimentaires.

III Conclusion du chapitre 4

Pour conclure, l'étude de la lixiviation d'additifs plastiques en conditions digestives in vitro peut être réalisée avec les deux modèles développés lors de ce travail et celle-ci peut être complexifiée, afin d'être plus réaliste, en utilisant des modèles enzymatiques de digestion dynamiques in vitro. L'utilisation de MP préalablement fabriqué avec une concentration connue d'additif plastique est, actuellement, la meilleure option afin de s'affranchir d'un quelconque effet mélange d'additifs lors de la lixiviation. Néanmoins, il est très important de s'assurer que l'additif plastique utilisé ne soit pas communément présent dans le matériel de laboratoire ou au moins s'assurer que les concentrations utilisées dans les expérimentations soient supérieures au bruit de fond analytique. Il n'en reste pas moins indispensable d'effectuer des études sur la lixiviation d'additifs plastiques en condition digestive afin de savoir si ces polluants peuvent se transférer aux organismes ingérant des MP.

Chapitre 5 Discussions, perspectives et conclusions



Les objectifs principaux de ce travail de thèse étaient d'évaluer la contamination des produits de la pêche par les « microplastiques » et *in fine* son éventuel risque pour le consommateur. Afin de répondre à ces objectifs, il a fallu dans un premier temps développer des méthodes robustes pour l'extraction et pour d'identification des MP provenant des produits de la pêche (**Chapitre 2**). Dans un deuxième temps, la présence de MP dans différents produits de la pêche, incluant deux espèces de bivalves et trois espèces de poissons, a été explorée. En parallèle, des additifs plastiques incluant des PBDE et des phtalates ainsi que des composés organiques hydrophobes, incluant des HAP, des PCB et des pesticides organochlorés ont été quantifiés dans les tissus des produits de la pêche afin de pouvoir établir un lien entre la contamination aux MP et la concentration de ces produits chimiques (**Chapitre 3**). Finalement, la lixiviation d'un additif plastique dans des conditions digestives *in vitro* a été étudiée afin d'évaluer si l'ingestion de MP pouvait être une source d'additif plastique pour les organismes ingérant ces particules (**Chapitre 4**).

I L'étude des microplastiques dans les produits de la pêche : harmonisation des méthodes et des définitions

Les réflexions énoncées dans cette partie s'appliquent principalement à la recherche des MP dans les produits de la pêche. Néanmoins, il est possible d'appliquer une grande partie de ces remarques aux autres matrices environnementales comme les sédiments, la colonne d'eau et les autres organismes marins ainsi qu'aux aliments.

I.1 Harmoniser les méthodes d'études des microplastiques dans les produits de la pêche vers une possible comparaison des données

Malgré le nombre croissant de publication sur la thématique des MP (Figure 2), aucune méthode harmonisée pour l'étude de ces particules dans les produits de la pêche n'est actuellement disponible rendant difficile la comparaison des données.

Lors de ces travaux de thèse, un important travail de développement méthodologique a été effectué dans l'optique de fournir des méthodes robustes et applicables par toutes les équipes de recherche travaillant sur cette thématique.

Dans un premier temps, la sélection d'un protocole permettant la digestion des tissus des produits de la pêche sans dégrader les principaux polymères plastiques a été réalisée (**Article 2**). Après une optimisation du protocole utilisé par [Foekema *et al.* \(2013\)](#), le KOH 10% incubé à 60°C pendant 24h a démontré être le meilleur compromis pour digérer différents produits de la pêche sans affecter de nombreuses familles de plastiques (**Article 2**).

Depuis la publication de ces résultats, d'autres études ont développé des protocoles utilisant des enzymes seules (Catarino *et al.*, 2017; Courtene-Jones *et al.*, 2017) ou en combinaison (Budimir *et al.*, 2018; Löder *et al.*, 2017). Néanmoins, ces approches enzymatiques sont uniquement applicables sur des bivalves et avec des temps d'analyses très long qui sont difficilement compatibles avec le nombre d'échantillons nécessaire pour étudier la contamination des produits de la pêche (Catarino *et al.*, 2017; Courtene-Jones *et al.*, 2017; Löder *et al.*, 2017). A titre de comparaison, la méthode au KOH 10% permet de digérer les tissus de produit de la pêche en seulement 24h, ce qui la rend applicable à grande échelle. De plus, la méthode sélectionnée dans l'article 2 a été confirmée par d'autres études qui ont montré que ce produit chimique n'avait pas d'effets délétères sur les principaux polymères plastiques et qu'il permettait aussi une bonne digestion des tissus des produits de la pêche (Karami *et al.*, 2017c; Kühn *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b). Toutefois, ce protocole n'est applicable de manière optimale qu'en respectant une limite maximale de masse à digérer. Les limites d'application pour le protocole de digestion au KOH 10% ont été déterminées dans l'article 3. En dépit d'une forte variabilité interindividuelle pour une même espèce et d'une même classe de taille, les limites de la méthode pour la digestion des TGI sont les suivantes : 7,5 g pour la sole et le maquereau et 15 g pour la daurade royale, le bar et le merlan. Ces limites de masses maximales de TGI correspondent à des tailles d'environ 31,5 et 27,5 cm pour les soles et les maquereaux et à 27,5, 29,7 et 34,5 cm pour les merlans, les daurades royales et les bars, respectivement. Ces limites exprimées en regard de la taille des espèces sont à prendre en considération lors des échantillonnages.

Pour compléter ces travaux, les limites de masses de TGI et de tailles d'un plus grand nombre d'espèces devraient être déterminées pour la méthode au KOH 10%, afin que celle-ci puisse être utilisée par un plus grand nombre d'équipes de recherche. De plus, la détermination de ces limites devra être réalisée pour des espèces ayant un intérêt commercial important mais aussi dont l'aire de répartition est importante afin d'effectuer des comparaisons entre continents. Le cabillaud pourrait servir d'espèce modèle.

Un autre point méthodologique, l'identification chimique des particules ressemblantes à des MP, est réalisée de manière variable et pas forcément systématiquement dans les différentes études. En effet, après la filtration des digestats, deux manières d'effectuer l'identification sont possibles : l'isolement manuel des particules sous loupe binoculaire ou l'analyse automatique des filtres avant la détection et l'identification (Frère *et al.*, 2016; Oßmann *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018b; Primpke *et al.*, 2017). En raison de sa facilité à mettre en place, l'isolement suivi d'une identification par spectroscopie μ -Raman ou par Py-

GC/MS ont été utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse bien que la sélection manuelle, le plus souvent à l'aide de pince, limite la taille minimale des particules récupérables. De plus, la sélection visuelle nécessite d'être réalisée par des personnes expérimentées pour limiter la variabilité interindividuelle notamment avec les particules translucides ou opaques qui sont difficiles à distinguer (Shim *et al.*, 2017). Ceci a été mis en évidence dans ces travaux de thèse où la sélection visuelle n'a pas permis d'effectuer un premier tri des MP et MP-like puisqu'au final seulement 5 à 32,8% des particules ont été identifiées comme des MP, *stricto sensu*, dans les bivalves (**Article 5**). Ces différentes limites liées au caractère manuel et subjectif dues à l'opérateur devraient être résolues en utilisant l'automatisation de la détection puis de l'identification des MP par spectroscopie Raman ou FTIR. Néanmoins, actuellement, l'automatisation en spectroscopie Raman ou FTIR a été développée pour des échantillons peu complexes incluant de l'eau en bouteille (Obmann *et al.*, 2017) ou des sédiments (Primpke *et al.*, 2017). Aucune étude identifiant les MP dans des produits de la pêche n'a été réalisée en utilisant l'analyse automatique des filtres. Pour aller plus loin, l'utilisation de méthodes d'identifications ajoutant une étape utilisant le rouge de Nil (Erni-Cassola *et al.*, 2017; Maes *et al.*, 2017; Shim *et al.*, 2016) permettrait la différenciation des MP des autres débris marins et permettre ainsi un gain de temps pour l'analyse.

A l'heure actuelle, les techniques permettant d'identifier les MP sont, la plupart du temps, utilisées séparément malgré le fait que celles-ci puissent être utilisées en synergie. Dans l'**article 4**, la Py-GC/MS s'est révélée être complémentaire de la spectroscopie μ -Raman car certaines particules identifiées comme des pigments avec le μ -Raman ont été identifiées comme des MP en Py-GC/MS. De plus, une étude a démontré depuis peu le caractère complémentaire de la Py-GC/MS et de la spectroscopie FTIR (Käppler *et al.*, 2018). Ces trois méthodes d'identification sont aussi complémentaires car elles sont utilisables pour analyser différentes gammes de tailles de particules. Une telle complémentarité entre FTIR et Py-GC/MS avait déjà été utilisée pour détecter des nanoplastiques et des MP dans des échantillons d'eau de surface provenant du Gyre Subtropical de l'Atlantique Nord (Ter Halle *et al.*, 2017). De plus, de récents travaux ont proposé un système combinant le FTIR et la Py-GC/MS afin de pouvoir identifier les MP et les nanoplastiques présents dans des échantillons environnementaux (Mintenig *et al.*, 2018). Toutefois, ces deux études ont utilisées une méthode permettant de concentrer les nanoparticules avant de pouvoir les analyser par Py-GC/MS (Mintenig *et al.*, 2018; Ter Halle *et al.*, 2017).

Dans la continuité de ces travaux de thèse, il serait intéressant de pouvoir compléter le développement méthodologique réalisé pour la Py-GC/MS (**Article 4**) afin de pouvoir

analyser de plus petits MP voir des nanoplastiques. Dans un premier temps, l'utilisation des ions caractéristiques, en spectrométrie de masse, des différents polymères plastiques pourra permettre de diminuer les LOD calculées dans l'article 4. Dans un second temps, un développement méthodologique devra être effectué afin de pouvoir identifier des particules de taille nanométrique par Py-GC/MS se trouvant en mélange dans des échantillons naturels. Ce complément de développement méthodologique devra permettre, après une étape de digestion puis de concentration, des potentiels MP ou nanoplastiques présents dans l'organisme considéré, de détecter et d'identifier les MP et nanoplastiques de manière plus directe et présents en mélange. La détection simultanée de plusieurs particules à la fois nécessitera, toutefois, le développement d'outils de traitement du signal : les outils chimiométriques. La détection et l'identification des plus petits MP et des nanoplastiques permettront de caractériser le risque que représentent ces particules pour le consommateur des produits de la pêche. De plus, l'utilisation de la Py-GC/MS pourra permettre, après ce type de développement, de donner des valeurs de contamination en g de MP/g de chair de produit de la pêche. Finalement, l'utilisation de « workflow » analytique prenant en compte la complémentarité des différentes méthodes d'identification des plastiques (micro et nano) permettra d'uniformiser les études ainsi que d'améliorer les résultats en terme analytique.

Globalement, au vu de la très grande variabilité des données présentées (échantillonnage, analyse des MP, identification ...) dans les études sur les MP dans les produits de la pêche, il y a une vraie nécessité à harmoniser les protocoles. Dans l'attente d'un consensus, il est primordial et ceci à court terme, de bien définir les différentes informations indispensables des modes opératoires pour pouvoir publier, allant de l'échantillonnage à l'identification des particules. Récemment, [Hermsen et al. \(2018\)](#) ont proposé un certain nombre de pistes. Sur cette base, il serait intéressant qu'une réflexion internationale soit engagée afin d'affiner et de mettre en commun les idées pour harmoniser et créer un protocole unique. D'ores et déjà, le Tableau 23 apporte des éléments de réflexions dont un certain nombre d'éléments indispensables et facultatifs à inclure dans les publications sur la thématique. Ce type d'informations, à minima les indispensables, permettra une comparaison plus aisée entre les différentes études.

Tableau 23 : Récapitulatif des informations indispensables (I) et facultatives (F) à retrouver dans une publication sur les microplastiques dans les produits de la pêche. Adapté d'après [Bustin et al. \(2009\)](#)

Paramètres à vérifier		Paramètres à vérifier	
Echantillonnage		Digestion des tissus (suite)	
Nombre d'individus	I	Température de l'appareil pour la digestion	I
Localisation (coordonnées GPS)	I	Température dans le digestat	F
Taille ^a	I	Suivi de température pendant la digestion	F
Taille commerciale (si évaluation du risque)	F	Temps de digestion	I
Poids total et des tissus	I	Vitesse d'agitation pendant la digestion	I
Processus d'extraction des tissus (nettoyage des échantillons, organes prélevés)	I	Filtration	
Temps d'exposition des échantillons à l'air ambiant	F	Procédure de nettoyage du matériel	I
Méthode de conservation (congélation, produits chimiques ...)	I	Type de filtre utilisé	I
Preuve d'innocuité de la méthode de conservation, si produit chimique, sur les MP	I	Procédure de stockage des filtres	F
Temps de conservation	F	Comptage ^b	
Environnement de travail		Méthode utilisée (manuelle vs automatique)	I
Type de blouse portée (coton ou autre)	I	Description des particules (forme, taille, couleur, photographie)	I
Environnement de travail (PSM, hotte, autre)	I	Comptage des particules dans les blancs et les échantillons	I
Procédure (fréquence, produits ...) de nettoyage	I	Identification	I
Contrôles		Nombre de particules analysées et proportion par rapport au total	I
Description (atmosphérique, solutions ...)	I	Méthode d'identification utilisée (Raman, FTIR, Py-GC/MS ...)	I
Nombre	I	Critère de performance de la méthode (optimisation, validation ...)	F
Localisation et pour quelles étapes	I	Utilisation de plastiques de références	I
Surface couverte	F	Contrôles (négatifs, positifs, plastiques de références)	F
Temps d'exposition	F	Score d'identification et valeurs minimales tolérées	I
Digestion des tissus		Identification par une seconde méthode si non identifiée	F
Utilisation de produits filtrés exempts de MP	I	Présentation et analyse des données	
Procédure de nettoyage du matériel	I	Disponibilité publique des résultats	F
Produit chimique utilisé	I	Description de la prise en compte des contrôles	I
Preuve d'innocuité du produit chimique utilisé sur les MP	I	Résultats d'identification (% identifié vs % non identifié, % MP et % non MP)	I
Taux de récupération des MP avec la méthode	I	Résultats contrôle négatif/positif	F

Proportion solution/g d'échantillons	I	Séparation MP (sens stricte) des autres types de particules	I
Modèles des appareils	I	Unités adaptées (MP/g de chair & MP/indiv)	I
Type de chauffage	F	Estimation de la masse des MP à l'aide de l'identification et de la taille	F
^a d'après le guide d'Ifremer (http://archimer.ifremer.fr/doc/00001/6237/)			
^b Dépend de la stratégie d'analyse utilisée (analyse manuelle vs automatique)			

I.2 Les microplastiques : une histoire de taille

Comme pour les méthodes d'extractions puis d'identifications des MP dans les produits de la pêche et malgré le nombre croissant d'études sur les MP au cours de ces dernières années (Figure 2), il n'existe pas de gamme de taille faisant consensus classifiant une particule de plastique comme un microplastique. En effet, les limites hautes et basses définissant un MP peuvent différer d'une équipe de recherche à une autre. Historiquement, dans l'étude de [Thompson *et al.* \(2004\)](#), les microplastiques ont été définis comme des particules de taille millimétriques et submillimétriques avec des tailles avoisinant la vingtaine de micromètres. Depuis, la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) a défini les MP comme des particules ayant des tailles inférieures à 5 mm ([Arthur *et al.*, 2009](#)). Cette limite haute a été reprise par de nombreux groupes de travail dont celui de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), du Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) et du sous-groupe sur les déchets marins de la Marine Strategy Framework Directive (MSFD) ([Directive Strategy Framework, 2013](#); [GESAMP, 2017](#); [Lusher *et al.*, 2017a](#)). Néanmoins, certains auteurs utilisent encore la limite haute de 1 mm qui correspond à la définition du préfixe « micro- » du système international des unités ([Karami *et al.*, 2017c](#); [Wright et Kelly, 2017](#)). Concernant la limite basse définissant les microplastiques, deux tailles sont couramment rencontrées dans la littérature : 100 ou 1000 nm en fonction des groupes de travail ou des auteurs ([GESAMP, 2017](#); [Gigault *et al.*, 2018](#); [Lusher *et al.*, 2017a](#)). D'après la norme ISO/TS 80004-2:2015, les nanomatériaux sont définis comme des particules ayant une ou plusieurs dimensions comprises entre 1 et 100 nm ([International Organization for Standardization \(ISO\), 2015](#)).

Les techniques d'échantillonnage ou de filtration peuvent avoir des conséquences sur la limite basse des MP considérée dans les études. Un exemple démonstratif est l'échantillonnage de MP à l'aide de filets à la surface des plans d'eaux (rivières, mers, océans etc). La limite des mailles des filets va directement impacter la taille limite basse des MP pouvant être récupérés. En effet, les mailles des filets peuvent être, par exemples, de 50 µm

(Song *et al.*, 2014), de 80 μm (Norén, 2007) ou de 333 μm (Collignon *et al.*, 2012) et ceci peut mener à une hétérogénéité dans les résultats qu'il est nécessaire de prendre en compte. La même chose est observée pour les études sur la contamination aux MP des produits de la pêche qui utilisent la filtration comme moyen de récupération des particules plastiques. En effet, la porosité des filtres utilisés n'est jamais la même avec, la plupart du temps, des porosités allant de 1,6 μm (Dehaut *et al.*, 2016) à 149 μm (Karami *et al.*, 2017a; Karami *et al.*, 2018). Cette hétérogénéité de la taille de la porosité provoque une variabilité dans les résultats obtenus, ce qui une fois encore rend difficile la comparaison, entre les études. Malgré le fait que ces différences soient liées à des contraintes méthodologiques, il est néanmoins nécessaire d'harmoniser ces différentes techniques afin de rendre les études comparables.

Récemment, certaines études ont indiqué que la seule estimation de la taille maximale des MP ne permettait pas d'être représentatif. Les MP sont des particules tridimensionnelles avec une variété de formes importantes menant à des différences de poids (Filella, 2015; Simon *et al.*, 2018) et peut-être de toxicité envers les organismes. Certains auteurs ont notamment suggéré très récemment d'estimer la masse des MP dans les études (Mintenig *et al.*, 2018; Simon *et al.*, 2018). Lors du travail sur l'optimisation de la méthode de Py-GC/MS (**Article 4**), les LOD ont été exprimées en masse car cette méthode est dépendante de la quantité des particules et pas seulement des tailles de la plus grande longueur. En effet, en fonction de la forme des particules, la masse de celles-ci est très variable en considérant une même longueur maximale. En effet, pour des particules sous forme de fragment (représentée par un cube), de microbille (représentée par une sphère) et de fibre (représentée par un cylindre), les volumes pour une longueur maximale de 5 mm sont très différents : 125, 65 et 0,01 μm^3 pour un fragment, une microbille et une fibre (diamètre = 50 μm). Le volume calculé ici pour la fibre représente moins de 0,01% du volume du fragment (Figure 28). En prenant l'exemple du PE pour des tailles identiques les masses sont différentes : 121 mg, 63 mg et 9,7 μg pour le fragment, la microbille et la fibre, respectivement (Figure 28).

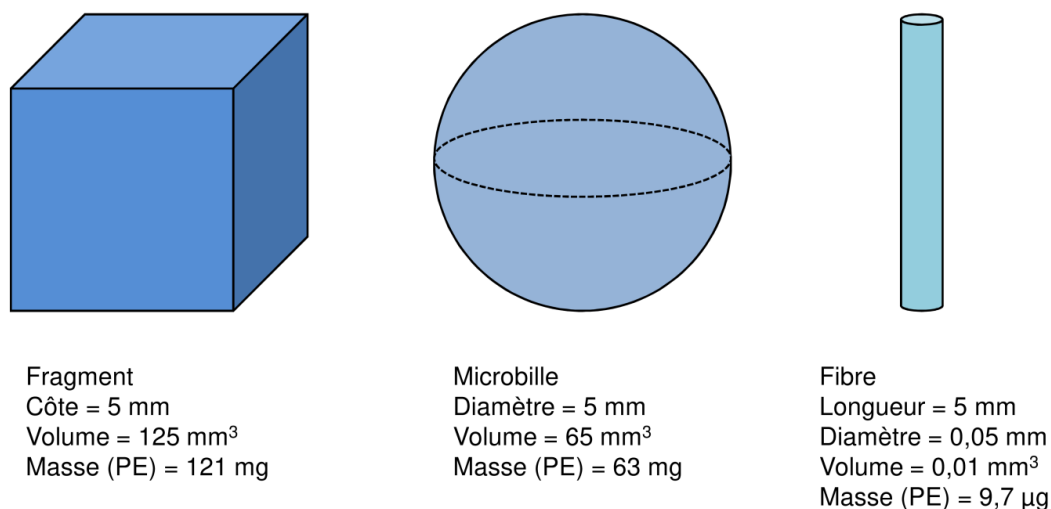


Figure 28 : Schéma de différentes formes (fragment, microbille et fibre) de microplastiques ayant une longueur maximale équivalente de 5 mm. Pour chaque forme, le volume (en mm³) et la masse pour un microplastique de PE (en mg et µg) ont été calculés.

Ces différences de masses en fonction des formes des particules peuvent avoir des répercussions sur l'impact toxicologique des MP. En effet, la quantité d'additifs pour une particule sous forme de fragment, de microbille ou de fibre n'est pas la même. De plus, les effets sur les organismes en fonction de la forme des particules peuvent être différents. Récemment, deux études ont démontré des effets plus sévères de MP sous forme de fibres ou de fragments sur des organismes en comparaison avec des MP sous forme de microbilles (Gray et Weinstein, 2017; Ziajahromi *et al.*, 2017a). De plus, l'estimation des masses des MP pourrait permettre de mieux comparer les différentes sources de ces particules dans le milieu marin. En outre, les modélisations et les estimations de la quantité de plastique présente dans les Océans sont données en tonnes de plastique (Eriksen *et al.*, 2014).

Dans les futures études, l'utilisation de la masse comme mesure additionnelle à la taille devrait être considérée à court terme et ceci afin de pouvoir offrir un outil de comparaison inter-études qui prend en compte la grande variabilité des formes de MP retrouvées dans l'environnement et les organismes marins. Par ailleurs, l'étude de l'impact sur les organismes de différentes formes des MP à masse équivalente devrait être réalisée afin de mieux appréhender les effets délétères des fibres et des fragments en comparaison avec les microbilles.

II Contamination des produits de la pêche par les microplastiques

Pour les deux espèces de bivalves, la coque (*Cerastoderma edule*) et la moule (*Mytilus edulis*), la contamination aux MP variait entre $0,56 \pm 0,22$ (± 2 S.E) et $2,46 \pm 1,16$ MP/individu et entre $0,15 \pm 0,06$ et $0,74 \pm 0,35$ MP/g de chair humide, en fonction des

espèces et des sites d'échantillonnages. En prenant en compte les fibres ainsi que les pigments additionnés aux MP, les résultats de contamination se situaient entre $2,68 \pm 1,33$ et $3,2 \pm 0,6$ particules/individu et $0,59 \pm 0,12$ et $1,02 \pm 0,28$ particules/g de chair humide (**Article 5**). Les résultats obtenus pour ces deux espèces, échantillonnées le long des côtes de la Manche, sont en accord avec les données publiées dans la littérature pour des espèces de bivalves prélevées le long des côtes européennes (Chapitre 1 – Tableau 3) ([De Witte et al., 2014](#); [Digka et al., 2018](#); [Li et al., 2018c](#); [Phuong et al., 2018a](#); [Railo et al., 2018](#); [Van Cauwenberghe et Janssen, 2014](#); [Van Cauwenberghe et al., 2015](#)). L'intérêt d'étudier la contamination par les MP de ces espèces est multiple. En premier lieu, ces espèces sont des bivalves filtreurs qui consomment les particules qui se trouvent dans la colonne d'eau environnante. Ces espèces sont donc directement exposées aux MP présents dans leurs environnements et peuvent donc être indicatrices de la pollution du milieu. Cette caractéristique est notamment utilisée à travers le monde afin de caractériser la pollution des milieux aquatiques, comme par exemple dans le programme « mussel watch » ([Goldberg, 1975](#)). En deuxième lieu, ces deux espèces ont été choisies car même si elles s'alimentent de la même façon, elles n'occupent pas la même position dans la colonne d'eau. La coque se situe à l'interface eau-sédiment alors que la moule vit plus en hauteur dans la colonne d'eau que ce soit en aquaculture (bouchot, filière ...) ou naturellement fixée sur la roche. Ces différentes positions dans la colonne d'eau peuvent mener à des différences de contamination due à des écarts de contamination entre la colonne d'eau et le sédiment. Néanmoins, lors de cette étude, aucune réelle tendance de contamination n'a pu être mise en évidence que ce soit en fonction des sites de prélèvement ou en fonction des espèces. Finalement, en troisième lieu, ces deux espèces ont des intérêts socio-économiques importants. En effet, la moule est l'espèce de produits de la pêche (poisson frais inclus) la plus consommée en France avec 42 886 tonnes, en 2016 ([FranceAgriMer, 2017](#)). De plus, sa production est importante en France avec 47 369 tonnes produites en 2016 ([FAO, 2018b](#)). La consommation de la coque en France est plus anecdotique que celle de la moule car d'après les données de [FranceAgriMer \(2017\)](#) celle-ci représente moins de 8 623 tonnes consommées en France et en 2016. Cette donnée de consommation prend en compte la coque et d'autres coquillages fouisseurs (palourdes par exemple) ([FranceAgriMer, 2017](#)).

Lors de cette étude de la contamination d'espèces de bivalves le long des côtes de la Manche, les particules isolées sous loupe binoculaire ont toutes été analysées en spectroscopie μ -Raman. Les valeurs de contamination aux MP données dans l'**article 5** sont robustes car toutes les particules ont bien été identifiées comme du plastique. L'identification des

particules ressemblantes à des MP n'est pas réalisée dans toutes les études et même quand celle-ci est réalisée, elle est souvent effectuée sur une partie seulement des particules trouvées. Ceci suggère que, contrairement à cette étude, des extrapolations de contamination aux MP existent dans les autres études. Dans la présente étude, 50 individus par espèce et par site ont été prélevés, comme recommandé par les institutions ([Directive Strategy Framework, 2013](#); [OSPAR, 2015](#)). De plus, les individus échantillonnés dans le cadre de ce travail de thèse étaient tous plus grands que la taille réglementaire de pêche ; de 30 et 40 mm pour les coques et les moules respectivement, dans le cas de la pêche de loisir ([LegiFrance, 2018](#)). Le fait d'utiliser des individus de tailles commerciales est important dans le cas où l'étude vise à évaluer le risque pour le consommateur.

Concernant l'étude de la contamination des tissus, tractus gastro-intestinaux (TGI) et filets, de trois espèces de poissons incluant la sole (*Solea solea*), le merlan (*Merlangius merlangus*) et le maquereau (*Scomber scombrus*) échantillonnés en mer du Nord et en Manche, la contamination aux MP est faible (Chapitre 3 – Section II). À cause de problèmes méthodologiques évoqués dans le **chapitre 2**, la digestion des TGI des merlans et des maquereaux n'a pas pu être effectuée car ceux-ci ont des poids supérieurs aux limites d'application du protocole KOH 10% établies dans l'**article 3**. Les TGI de soles ont pu être digérés et les particules ressemblantes à des MP ont pu être comptées puis identifiées par Py-GC/MS. Il est important de noter que seulement les particules sous forme de fragments et les fibres de tailles supérieures à 1 mm (longueur maximale) ont été analysées par Py-GC/MS. Les fibres ayant des tailles inférieures à 1 mm avaient des poids inférieurs à la LOD de la méthode développée (**Article 4**). Sur un total de 46 particules analysés, seulement 4 ont été identifiées comme du plastique. Le pourcentage de particules identifiées est faible et inférieur à 10%. Ceci démontre bien la nécessité d'utiliser des méthodes chimiques d'identification (section I.1) afin de s'assurer de la nature des particules considérées comme des MP. La contamination des TGI de soles, $0,08 \pm 0,08$ MP/sole et $0,02 \pm 0,02$ MP/g de chair, de ce travail de thèse est très faible en comparaison avec d'autres études sur des poissons benthiques ([Lusher et al., 2013](#); [Pellini et al., 2018](#); [Welden et al., 2018](#)). Ceci peut venir du fait d'une faible contamination des sites échantillonnés ou des différences méthodologiques. Il demeure encore un manque de standardisation entre les études sur les microplastiques (section I.1).

Avant passage de certaines particules, retrouvées dans les filets de poissons, sous forme de fragments en Py-GC/MS pour confirmation de la nature synthétique, la contamination aux MP-like était assez forte pour les trois espèces. En effet, 100% des filets de soles et de

merlans et 86% des filets de maquereaux étaient contaminés par des particules ressemblantes à des MP. Après analyses des MP-like par Py-GC/MS, le pourcentage de contamination des filets de merlans et de maquereaux a fortement diminué. En effet, seulement 12% et 24% des filets de merlans et de maquereaux étaient, respectivement, contaminés par des MP. Comme déjà précédemment dit, ceci démontre l'importance d'utiliser des techniques d'identifications des particules ressemblantes à des MP, afin de ne pas surestimer la contamination des espèces étudiées (section I.1). Néanmoins, même si la présence de MP-like et de MP *stricto sensu* a été montrée dans ce travail de thèse (Chapitre 3 – Section II), il est nécessaire d'être précautionneux dans l'interprétation de ces résultats. En outre, malgré le fait d'avoir pris des mesures de prévention de la contamination et d'avoir pris en compte la contamination aéroportée dans le calcul de la contamination des filets par les MP-like, ces particules ont, tout de même, été observées dans les filets des trois espèces étudiées. A la vue de la taille des particules (>50 µm) et de la quantité trouvée, il apparaît peu probable que le phénomène impliqué ici soit celui de la translocation des particules à travers l'épithélium intestinale (Paul-Pont *et al.*, 2018). En effet, ce phénomène a été mis en évidence pour des particules de tailles nanométriques, dans plusieurs études (Løvmo *et al.*, 2017; Petrie et Ellis, 2006), jusqu'à des tailles de l'ordre de la dizaine de micromètres. Dans les études ayant montré de la translocation de MP vers les filets ou le foie de plusieurs espèces de poissons, des réserves sont à prendre concernant l'interprétation des résultats suite à des problèmes méthodologiques (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Avio *et al.*, 2015b; Collard *et al.*, 2017a; Collard *et al.*, 2018). Ces problèmes incluent la non prise en compte de la contamination aéroportée, la non identification des particules ressemblantes à des MP trouvées dans les organes cibles et la non discussion de la taille des particules translocant (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Avio *et al.*, 2015b; Collard *et al.*, 2017a; Collard *et al.*, 2018). En effet, dans toutes les études citées, les particules translocant ont toutes des tailles supérieures à 10 µm.

L'évaluation du danger « microplastique » pour les parties consommables des poissons n'est pas possible si le phénomène de translocation n'est pas décrit de manière précise et sans ambiguïté et ce contrairement aux études publiées à ce jour (Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Avio *et al.*, 2015b; Collard *et al.*, 2017a; Collard *et al.*, 2018). De plus, actuellement le phénomène de translocation pour les MP n'a pas été caractérisé avec des techniques dédiées, comme la chambre d'Ussing par exemple (Hamilton, 2011; Herrmann et Turner, 2016).

Pour mieux comprendre le devenir des MP dans les tissus des produits de la pêche, la translocation devra être étudiée en utilisant des techniques adéquates pour l'étude de ce

phénomène (Paul-Pont *et al.*, 2018). Le but de ce type d'étude, *in fine*, serait de pouvoir évaluer si les MP sont un danger pour le consommateur de produits de la pêche lorsque celui-ci consomme des filets de poissons. De plus, comme la translocation des nanoplastiques a déjà été démontrée, il serait intéressant de pouvoir analyser ces particules dans les filets de poissons. Néanmoins, aujourd'hui, aucune méthode ne permet d'extraire puis d'identifier ce type de nanoparticules dans une matrice aussi complexe que des muscles de poissons. A long terme, il est essentiel de développer ce type de méthode, dans un premier temps, sur des poissons artificiellement exposés à des nanoplastiques puis d'appliquer, dans un second temps, la méthode sur des poissons provenant du milieu naturel. Dans ce cas précis, l'utilisation de la Py-GC/MS peut être une piste sérieuse, comme déjà énoncée dans la partie I.1 de ce chapitre.

Afin de comparer l'apport de différents aliments dans la contamination humaine aux MP, l'apport journalier en MP pour la consommation d'eau en bouteille, de bière, de sel de table, de miel et de différents produits de la pêche a été calculé (Tableau 24). L'apport des différents produits alimentaires va majoritairement dépendre, premièrement, de la contamination de ces produits et, deuxièmement, de la consommation journalière de ce produit. En effet, un produit fortement contaminé en MP mais peu consommé pourra être à l'origine d'un moindre risque pour l'homme en comparaison avec un produit moins contaminé en MP mais plus fortement consommé. Le Tableau 24 met en évidence que l'apport le plus important de MP dans le régime alimentaire humain se fait par la consommation d'eau potable en bouteille suivi par la consommation de mollusques bivalves. En effet, sur l'ensemble de la population, la consommation d'eau en bouteille peut mener à la consommation maximale de 4039 MP/j alors que pour les seuls consommateurs d'eau en bouteille, cette consommation est de 5782 MP/j. Concernant, les produits de la pêche, et plus particulièrement les bivalves, leurs consommations entraînent un apport de maximum 111 MP/j dans le cas de l'ensemble de la population et jusqu'à 289 MP/j pour les 5% des consommateurs mangeant le plus ces produits (Tableau 24). Même si l'apport des bivalves semble important dans la consommation par l'Homme de MP, celui-ci est toutefois inférieur à l'apport par l'eau en bouteille d'un facteur 36 pour l'ensemble des consommateurs. Les autres produits de consommation, dans lesquels la présence de MP a été confirmée, contribuent de manière encore moins importante à l'apport de ces particules dans le régime alimentaire humain. Le sel, le miel, la bière et les poissons en conserves sont responsables de l'ingestion par l'Homme de moins de 3 MP/j pour l'ensemble des consommateurs et de moins de 15 MP/j pour les consommateurs seuls (Tableau 24). Au vu des données brutes présentes dans le

Tableau 24, l'apport principal de MP dans le régime alimentaire de l'Homme semble être l'eau de consommation en bouteilles.

Un point important, concernant ces données, est à mettre en relief pour leurs interprétations réalisées ci-dessus. En effet, les données pour tous les produits, à l'exception des données sur les produits de la pêche obtenues lors de ces travaux de thèse, proviennent de différents travaux ayant utilisés des méthodes d'isolement et d'identification très variées. Les travaux d'[OBmann et al. \(2018\)](#), permettant de trouver le plus fort apport de MP par jour, sont ceux qui utilisent la méthode de détection et d'identification la plus précise : une détection et identification automatique en μ -Raman jusqu'à une limite détectable de 1 μm . Comme montré dans d'autres études ([Erni-Cassola et al., 2017](#); [Phuong et al., 2018a](#)), la quantité de MP augmente avec une diminution de la taille des particules et lorsque les études font l'impasse sur les plus petits MP, par exemple [Karami et al. \(2017a\)](#) et [Karami et al. \(2018\)](#) ont filtré jusqu'à 149 μm , ceci diminue fortement la contamination des produits de consommation et donc l'apport de MP via ces produits. Ce point concernant le manque d'harmonisation des méthodes, discuté dans la partie I.1 de ce chapitre, peut aussi être à l'origine des différences d'apport de MP dans le régime alimentaire de l'Homme. Il est donc, au vu de ces différences méthodologiques, compliqué de pouvoir réellement trancher que l'eau en bouteille soit la source principale de MP et que cette source soit le plus grand risque pour la consommation humaine. A ce jour, si aucune harmonisation des méthodes n'est mise en place, il ne sera pas possible d'évaluer le risque MP pour l'Homme.

Une fois qu'une méthode harmonisée sera en place et admise par toute la communauté travaillant sur les MP, il serait intéressant de réaliser une étude de la contamination de différents produits alimentaires afin d'évaluer le risque des MP pour l'Homme. Il serait nécessaire d'inclure, au vu de la récente littérature, des expériences de comparaison de la contamination brute de différents produits alimentaires et de la contamination de ces mêmes produits après préparation par le consommateur. En effet, [Catarino et al. \(2018\)](#) a mis en évidence que la contamination de moules est plus importante lors de la préparation de celles-ci en comparaison avec des moules non préparées. Ceci met en évidence que la pollution atmosphérique par les MP (principalement des fibres) est importante et que celle-ci peut même être majoritaire dans certains cas. Cette pollution atmosphérique doit être prise en compte dans les prochaines études, notamment, pour estimer sa contribution à l'apport de MP dans le régime alimentaire.

Tableau 24 : Apport de différents aliments dans la contribution à la consommation humaine de microplastiques. Les données de consommation des différents produits ont été obtenues dans l'étude INCA 2 (Anses, 2016) à l'exception des données concernant les produits de la pêche qui proviennent de l'étude CALIPSO (Leblanc, 2006).

Matrice	Données de contamination MP (MP/ml ou MP/g)			Consommation journalière moyenne de produit (ml ou g/j)			Apport journalier de MP pour l'ensemble de la population (MP/j)			Apport journalier de MP pour les seuls consommateurs (MP/j)			Réf
	Moyenne	Min	Max	Ensemble de la population	Seuls consommateurs	% de consommateurs	Moyenne	Min	Max	Moyenne	Min	Max	
Eau en bouteille (plastique)	0,014	0,002	0,044	403,9	578,2	69,9	5,65	0,81	17,77	8,09	1,16	25,44	[1]
Eau en bouteille (verre)	0,05	0,004	0,156	403,9	578,2	69,9	20,20	1,62	63,01	28,91	2,31	90,20	[1]
Eau en bouteille (plastique)	2,649	-	-	403,9	578,2	69,9	1069,93	-	-	1531,65	-	-	[2]
Eau en bouteille (verre)	6,292	-	-	403,9	578,2	69,9	2541,34	-	-	3638,03	-	-	[2]
Eau en bouteille (plastique)	0,325	0	10	403,9	578,2	69,9	131,27	0,00	4039,00	187,92	0,00	5782,00	[3]
Bière	-	0,002	0,109	24,8	135,4	18,3	-	0,05	2,70	-	0,27	14,76	[4]
Sel	-	0,007	0,68	0,2	1	21,7	-	0,01	0,14	-	0,01	0,68	[5]
Sel	0,13 ^a	0,05	0,28	0,2	1	21,7	0,03	0,01	0,06	0,13	0,05	0,28	[6]
Sel	-	0	0,01	0,2	1	21,7	-	0,00	0,00	-	0,00	0,01	[7]
Miel	-	0	0,66	1,3	9	21,7	-	0,00	0,86	-	0,00	5,94	[8]
Poisson en conserve	-	0	0,05 ^b	17,9 ^{c,d}	54,4 ^{c,d,e}	95	-	0,00	0,85	-	0,00	2,59	[9]
Moule	0,20	0	2,88	3,3 ^{c,d}	10 ^{c,d,e}	95	0,66	0,00	9,46	2,00	0,00	28,78	Thèse
Coque	0,47	0	1,09	0,3 ^{c,d}	1,8 ^{c,d,e}	95	0,16	0,00	0,38	0,83	0,00	1,96	Thèse
Bivalve	0,33	0	2,88	38,6 ^{c,d}	100,4 ^{c,d,e}	95	12,86	0,00	111,00	33,49	0,00	289,00	Thèse
Maquereau	0,005	0	0,04	3,8 ^{c,d}	15,6 ^{c,d,e}	95	0,02	0,00	0,15	0,08	0,00	0,63	Thèse
Merlan	0,001	0	0,01	3,6 ^{c,d}	17,9 ^{c,d,e}	95	0,00	0,00	0,04	0,02	0,00	0,18	Thèse
Filet poisson	0,005	0	0,04	90 ^d	213 ^{c,d,e}	95	0,45	0,00	3,60	1,07	0,00	8,52	Thèse

- : indique une absence de données et l'impossibilité de réaliser des calculs

^a moyenne calculé d'après les données de la publication ; ^b données en MP/conserve avec 8 MP pour 168 g total ; ^c données initiales en g/semaine convertie en g/j ; ^d données pour un homme de 18 à 64 ans ; ^e pas données moyenne de consommation pour les consommateurs seul d'où l'utilisation de la consommation pour 5% des plus gros consommateurs

[1] Schymanski *et al.* (2018) ; [2] Oßmann *et al.* (2018) ; [3] Mason *et al.* (2018) ; [4] Liebezeit et Liebezeit (2014) ; [5] Yang *et al.* (2015) ; [6] Iñiguez *et al.* (2017) ; [7] Karami *et al.* (2017b) ; [8] Liebezeit et Liebezeit (2013) ; [9] Karami *et al.* (2018)

III Les additifs plastiques : un danger peu étudié

Malgré le fait que les additifs plastiques soient présents dans tous les polymères plastiques, avec des concentrations parfois importantes, peu d'études, à ce jour, ont été réalisées sur ces produits chimiques en lien avec les MP. Dans le travail de revue bibliographique (**Article 1**), il a été démontré que ces additifs ont été détectés dans tous les environnements marins ainsi que dans un grand nombre d'organismes. Il a aussi été mis en évidence que la matière plastique pouvait être une source supplémentaire d'apport de ces additifs dans l'environnement et pour les organismes marins.

Lors de ces travaux de thèse sur l'étude des MP, dans les bivalves et dans les filets de poissons, l'analyse de la concentration de certains additifs plastiques et de HOC n'a révélé aucune relation avec la quantité en MP. Dans la littérature, des études ont mis en évidence un lien entre MP et contaminants mais ceci pour des espèces d'oiseaux ou de mammifères ingérant des plastiques de plus grande taille (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2013; Teuten *et al.*, 2009). L'échantillonnage des présentes études de thèse étant limité, il serait peut être intéressant de reproduire cette approche sur nombre plus important d'échantillons en diversifiant les espèces étudiées.

Malgré cela, il est important pour les futures études portant sur la contamination d'espèces de produits de la pêche d'inclure le dosage de certains additifs plastiques et HOC car c'est un élément essentiel quant à la possible toxicité due à la présence des MP. En effet, lors de l'étude de lixiviation d'un additif plastique présentée dans le **Chapitre 4**, l'omniprésence de l'irgafos 168[®] sous forme réduite et oxydée dans les divers emballages plastiques ainsi que dans les poudres des produits chimiques et des enzymes a engendré une contamination globale des différentes solutions réalisées. Bien que ce produit chimique soit bien moins étudié et donc moins retrouvé dans l'environnement et les organismes en comparaison avec d'autres additifs plastiques, comme les phtalates et les retardateurs de flammes, celui-ci a été détecté dans la quasi-totalité des produits chimiques utilisés dans ces expérimentations. Ceci traduit la grande ubiquité des additifs plastiques dans un grand nombre de matrice en contact avec la matière plastique. De plus, la contribution de ces différents produits chimiques dans la concentration en irgafos 168[®] oxydé retrouvés dans les filtres et les filtrats a pu être importante. En effet, les concentrations d'irgafos 168[®] oxydé introduites dans les différentes conditions par le Tris-HCl, l'acide citrique et les trois enzymes sont, probablement, bien au-dessus des concentrations ajoutées via les MP de PE-Irg.

Ceci montre qu'il apparait important pour engager des études de lixiviation d'additif plastique de prendre un maximum de précaution mais aussi d'étudier préalablement toutes les

possibilités de contamination croisée dans le laboratoire. Dans le cas présent, cette contamination croisée globale a limité les possibilités de formuler des conclusions sur le phénomène de lixiviation de l'irgafos 168[®] incubé dans des conditions digestives, *in vitro*, mimant la digestion pour un modèle poisson (20°C) et un modèle humain (37°C). La solution pourrait être l'utilisation d'une plus grande quantité (> 5 MP/mL) de PE additivé en irgafos 168[®] lors de manipulations complémentaires. Ceci pourrait permettre de se situer au-dessus du bruit de fond analytique tout en restant dans une concentration en MP proche de la réalité.

Il serait nécessaire de poursuivre ces expérimentations de lixiviation d'additifs plastiques présents dans des MP en conditions digestives *in vitro*, afin de savoir si ce phénomène survient et si oui, dans quelle mesure. Dans la continuité de ces travaux de thèse, à plus long terme, ces manipulations devraient être réitérées en utilisant plusieurs modèles de digestion *in vitro* (statique et dynamique) ou en utilisant directement des organismes marins pouvant être consommés par l'Homme. Certaines espèces de bivalves comme la moule ou l'huître pourraient être utilisées pour ces manipulations complémentaires car ce sont des espèces manipulables en laboratoire et ce sont aussi des espèces fortement consommées en France ([FranceAgriMer, 2017](#)). De plus, l'utilisation de particules fabriquées à façon en laboratoire pourra être employée dans l'exposition des organismes marins afin de mieux comprendre le rôle des additifs plastiques dans la toxicité des MP. Ceci permettra de mieux appréhender l'effet des additif plastiques, présent seul ou en mélange, dans la toxicité globale des MP ([Paul-Pont *et al.*, 2018](#)). De plus, au vu de l'ubiquité de l'irgafos 168[®] sous ses deux formes dans divers produits chimiques et emballages, il serait intéressant d'étudier la contamination globale aux additifs plastiques afin de savoir par quelle voie d'exposition un consommateur est contaminé par ces polluants. Le consommateur est-il susceptible d'être contaminé par ces additifs plastiques via la consommation d'aliments, dont les produits de la pêche, ou est-il susceptible d'être contaminé par ces polluants via d'autres sources comme la pollution atmosphérique. Comme dans l'exemple de l'étude de [Catarino *et al.* \(2018\)](#) où la contamination humaine aux MP proviendrait plus de la contamination atmosphérique de moules lors de la préparation du repas. Il est donc nécessaire, que ce soit pour les MP ou les additifs plastiques, de bien déterminer leurs sources dans le régime alimentaire humain afin de mieux comprendre le rôle des produits de la pêche dans l'exposition humaine à ces polluants.

IV Conclusion générale

L'objectif principal de ces travaux de thèse était d'évaluer le risque lié aux microplastiques pour le consommateur de produit de la pêche. Pour cela, il a fallu développer des méthodes permettant l'extraction puis l'identification des MP dans les tissus des produits de la pêche. Les méthodes développées au cours de ces travaux de thèse sont applicables par un grand nombre d'équipes de recherches car elles sont facilement transposables. Il est important, dans la continuité de ce travail, de développer des méthodes harmonisées afin de pouvoir comparer les données produites par les différentes équipes de recherche. Les méthodes mise au point dans ce travail ont ensuite été utilisées pour étudier l'occurrence de MP dans deux espèces de bivalves et trois espèces de poissons fréquemment consommés par l'Homme. Ces études ont montré une faible occurrence de MP dans les filets de poissons contrairement aux bivalves qui sont contaminés par en moyenne entre 0,15 à 0,74 MP/g de chair humide. Lors des calculs des apports de différents aliments dans l'exposition de l'Homme aux MP, il apparaît que les filets sont potentiellement des sources faibles en comparaison avec d'autres comme les bivalves ou l'eau de consommation. Néanmoins, l'évaluation du risque MP pour l'Homme nécessite que les études soient réalisées de la même manière, afin de pouvoir comparer les résultats. De plus, les MP sont des particules contenant un grand nombre de produits chimiques utilisés comme additifs et ces molécules sont pour certaines des perturbateurs endocriniens. Il est important de comprendre quels sont les effets sur l'Homme de l'ingestion de ces particules plastiques. Néanmoins, peu de choses sont connues pour ces additifs du fait que les formulations des matières plastiques relèvent du secret industriel et que ces produits chimiques soient peu étudiés. Le transfert de ces additifs plastiques aux organismes via la consommation de MP est à ce jour peu connu et devrait être étudié dans de futures études.

Pour conclure, ces travaux de thèse répondent de manière non exhaustive à la question du risque pour l'Homme lié à ces microplastiques mais permettent toutefois de proposer des pistes pour harmoniser les méthodes et mieux prendre en compte le danger lié aux additifs plastiques.

De manière beaucoup plus globale, la pollution des environnements terrestres et aquatiques par des plastiques de toutes tailles est un phénomène recevant, actuellement, de plus en plus d'attention que ce soit de la part des scientifiques comme des citoyens. Cette attention nouvelle doit permettre à tous de mettre en œuvre des solutions pour limiter les sources de ces plastiques dans les environnements pour minimiser au maximum leurs impacts qui sont encore peu connus.

Bibliographie

- Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., Hassanaghaei, M., 2018. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere*. 205, 80-87. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.076
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., Keshavarzi, B., 2018. Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in fish muscles from northeast of Persian Gulf. *Environmental Pollution*. 232, 154-163. doi: 10.1016/j.envpol.2017.09.028
- Al-Odaini, N.A., Shim, W.J., Han, G.M., Jang, M., Hong, S.H., 2015. Enrichment of hexabromocyclododecanes in coastal sediments near aquaculture areas and a wastewater treatment plant in a semi-enclosed bay in South Korea. *Science of The Total Environment*. 505, 290-298. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.019
- Altekruse, S.F., Bishop, R.D., Baldy, L.M., Thompson, S.G., Wilson, S.A., Ray, B.J., Griffin, P.M., 2000. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiology and Infection*. 124, 489-495.
- Anastasopoulou, A., Mytilineou, C., Smith, C.J., Papadopoulou, K.N., 2013. Plastic debris ingested by deep-water fish of the Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 74, 11-13. doi: 10.1016/j.dsr.2012.12.008
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1596-1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- Andrady, A.L., 2015. Persistence of Plastic Litter in the Oceans in Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 57-72.
- Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 1977-1984. doi: 10.1098/rstb.2008.0304
- Andrady, A.L., Rajapakse, N., 2017. *Additives and Chemicals in Plastics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1-17.
- Andrew, J.E., Anras, M.L.B., Kadri, S., Holm, J., Huntingford, F.A., 2003. Feeding Responses of Hatchery-Reared Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) to a Commercial Diet and Natural Prey Items. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 36, 77-86. doi: 10.1080/1023624031000109864
- Anses, 2010. Consommation des poissons, mollusques et crustacés : aspects nutritionnels et sanitaires pour l'Homme Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ALAN2006sa0035Ra.pdf>, Accédé le: 14/06/2018
- Anses, 2013. Poissons et produits de la pêche : synthèse des recommandations de l'Agence. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/poissons-et-produits-de-la-p%C3%A0che-synth%C3%A8se-des-recommandations-de-l%E2%80%99agence>, Accédé le: 07/05/2018
- Anses, 2016. Données de consommations et habitudes alimentaires de l'étude INCA 2. Disponible sur: <https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/donnees-de-consommations-et-habitudes-alimentaires-de-letude-inca-2-3/>, Accédé le: 29/08/2018
- Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt e.V., 2006. Plasticizers market data. Disponible sur: http://www.pvc-partner.com/fileadmin/user_upload/downloads/Weichmacher/Marktdaten_Weichmacher_230106.lin_en.pdf, Accédé le: 31/05/2016
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30.

- Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 60, 2050-2055. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.07.014
- Aucher, J., 2009. Etude comparative du comportement composites à matrice thermoplastique ou thermodurcissable, INSA de Rouen. INSA de Rouen.
- Austin, B., 2005. Bacterial Pathogens of Marine Fish in Belkin, S., Colwell, R.R. (Eds.), *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Springer US, Boston, MA, pp. 391-413.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F., 2015a. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine environmental research*. 111, 18-26. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.014
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015b. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*. 198, 211-222. doi: 10.1016/j.envpol.2014.12.021
- Baekeland, L.H., 1909. The Synthesis, Constitution, and Uses of Bakelite. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 1, 149-161. doi: 10.1021/ie50003a004
- Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*. 185, 16-23. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.007
- 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. *Environmental Pollution*. 219, 56-65. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.046
- Barboza, L.G.A., Dick Vethaak, A., Lavorante, B.R.B.O., Lundebye, A.-K., Guilhermino, L., 2018. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*. 133, 336-348. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.047
- Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 1985-1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205
- Barnes, D.K.A., 2002. Invasions by marine life on plastic debris. *Nature*. 416, 808. doi: 10.1038/416808a
- Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S., 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollution Bulletin*. 48, 1161-1167. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.04.009
- Beckingham, B., Ghosh, U., 2017. Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: Microplastic in comparison to wood, coal and biochar. *Environmental Pollution*. 220, 150-158. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.033
- Bejgarn, S., MacLeod, M., Bogdal, C., Breitholtz, M., 2015. Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*. 132, 114-119. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.010
- Belfroid, A., van Velzen, M., van der Horst, B., Vethaak, D., 2002. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere*. 49, 97-103. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00157-1
- Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., Martínez-Gómez, C., 2016. Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and

- Mediterranean coasts. *Marine Pollution Bulletin*. 109, 55-60. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.026
- Bellas, J., Albertosa, M., Vidal-Liñán, L., Besada, V., Franco, M.Á., Fumega, J., González-Quijano, A., Viñas, L., Beiras, R., 2014. Combined use of chemical, biochemical and physiological variables in mussels for the assessment of marine pollution along the N-NW Spanish coast. *Marine environmental research*. 96, 105-117. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.015
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2012. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 3798-3819. doi: 10.1007/s11356-012-1094-7
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2013. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environmental Science and Pollution Research*. 20, 8057-8076. doi: 10.1007/s11356-013-1982-5
- Berto, D., Rampazzo, F., Gion, C., Noventa, S., Ronchi, F., Traldi, U., Giorgi, G., Cicero, A.M., Giovanardi, O., 2017. Preliminary study to characterize plastic polymers using elemental analyser/isotope ratio mass spectrometry (EA/IRMS). *Chemosphere*. 176, 47-56. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.090
- Bessa, F., Barría, P., Neto, J.M., Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P., Marques, J.C., 2018. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 128, 575-584. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.044
- Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., Koelmans, A.A., 2014. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*. 48, 12336-12343. doi: 10.1021/es503001d
- Besseling, E., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2017. The Effect of Microplastic on the Uptake of Chemicals by the Lugworm *Arenicola marina* (L.) under Environmentally Relevant Exposure Conditions. *Environmental Science & Technology*. 51, 8795-8804. doi: 10.1021/acs.est.7b02286
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science & Technology*. 47, 593-600. doi: 10.1021/es302763x
- Bester, K., Theobald, N., Schröder, H.F., 2001. Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere*. 45, 817-826. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00023-6
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P., Ke, P.C., 2010. Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C*. 114, 16556-16561. doi: 10.1021/jp1054759
- Biginagwa, F.J., Mayoma, B.S., Shashoua, Y., Syberg, K., Khan, F.R., 2015. First evidence of microplastics in the African Great Lakes: Recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia. *Journal of Great Lakes Research*. 42, 146-149. doi: 10.1016/j.jglr.2015.10.012
- Billon, G., Ouddane, B., Boughriet, A., 2001. Chemical speciation of sulfur compounds in surface sediments from three bays (Fresnaye, Seine and Authie) in northern France, and identification of some factors controlling their generation. *Talanta*. 53, 971-981. doi: 10.1016/S0039-9140(00)00586-5
- Binetti, R., Costamagna, F.M., Marcello, I., 2008. Exponential growth of new chemicals and evolution of information relevant to risk control. *Annali-Istituto Superiore di Santa*. 44, 13.

- Blackburn, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J., 1999. Concentrations of alkyphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*. 38, 109-118. doi: 10.1016/S0025-326X(98)00104-0
- Blair, J.D., Ikonomou, M.G., Kelly, B.C., SurrIDGE, B., Gobas, F.A.P.C., 2009. Ultra-Trace Determination of Phthalate Ester Metabolites in Seawater, Sediments, and Biota from an Urbanized Marine Inlet by LC/ESI-MS/MS. *Environmental Science & Technology*. 43, 6262-6268. doi: 10.1021/es9013135
- Bodin, N., Abarnou, A., Fraisse, D., Defour, S., Loizeau, V., Le Guellec, A.M., Philippon, X., 2007. PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). *Marine Pollution Bulletin*. 54, 657-668. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.01.018
- Boerger, C.M., Lattin, G.L., Moore, S.L., Moore, C.J., 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*. 60, 2275-2278. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.08.007
- Bouwmeester, H., Hollman, P.C., Peters, R.J., 2015. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro-and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environmental Science & Technology*. 49, 8932-8947. doi: 10.1021/acs.est.5b01090
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-254.
- Braid, H.E., Deeds, J., DeGrasse, S.L., Wilson, J.J., Osborne, J., Hanner, R.H., 2011. Preying on commercial fisheries and accumulating paralytic shellfish toxins: a dietary analysis of invasive *Dosidicus gigas* (Cephalopoda Ommastrephidae) stranded in Pacific Canada. *Marine Biology*. 159, 25-31. doi: 10.1007/s00227-011-1786-4
- Bråte, I.L.N., Eidsvoll, D.P., Steindal, C.C., Thomas, K.V., 2016. Plastic ingestion by Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Norwegian coast. *Marine Pollution Bulletin*. 112, 105-110. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.034
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 178, 189-195. doi: 10.1016/j.ecss.2015.12.003
- Brennecke, D., Ferreira, E.C., Costa, T.M.M., Appel, D., da Gama, B.A.P., Lenz, M., 2015. Ingested microplastics (> 100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Marine Pollution Bulletin*. 96, 491-495. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.05.001
- Browne, M.A., Galloway, T., Thompson, R., 2007. Microplastic-an emerging contaminant of potential concern? *Integrated Environmental Assessment and Management*. 3, 559-561. doi: 10.1002/ieam.5630030412
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*. 42, 5026-5031. doi: 10.1021/es800249a
- 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. *Current Biology*. 23, 2388-2392. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.012
- Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science & Technology*. 45, 9175-9179. doi: 10.1021/es201811s

- Buchanan, J.B., 1971. Pollution by synthetic fibres. *Marine Pollution Bulletin*. 2, 23. doi: 10.1016/0025-326X(71)90136-6
- Budimir, S., Setälä, O., Lehtiniemi, M., 2018. Effective and easy to use extraction method shows low numbers of microplastics in offshore planktivorous fish from the northern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 127, 586-592. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.12.054
- Burton, G.A., 2017. Stressor Exposures Determine Risk: So, Why Do Fellow Scientists Continue To Focus on Superficial Microplastics Risk? *Environmental Science & Technology*. 51, 13515-13516. doi: 10.1021/acs.est.7b05463
- 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. *Clinical Chemistry*. 55, 611.
- Cai, M., He, H., Liu, M., Li, S., Tang, G., Wang, W., Huang, P., Wei, G., Lin, Y., Chen, B., Hu, J., Cen, Z., 2018. Lost but can't be neglected: Huge quantities of small microplastics hide in the South China Sea. *Science of The Total Environment*. 633, 1206-1216. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.197
- Camacho, W., Karlsson, S., 2000. Quality-determination of recycled plastic packaging waste by identification of contaminants by GC-MS after microwave assisted extraction (MAE). *Polymer Degradation and Stability*. 71, 123-134. doi: 10.1016/S0141-3910(00)00163-4
- CAMPUS, 2018. Disponible sur: <https://www.campusplastics.com/campus/list>, Accédé le: 26/01/2018
- Caporal-Gautier, J., Nivet J, M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu J, J., Russotto, R., 1992. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie. *STP pharma pratiques*. 2, 205-226.
- 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
- Carr, K.E., Smyth, S.H., McCullough, M.T., Morris, J.F., Moyes, S.M., 2012. Morphological aspects of interactions between microparticles and mammalian cells: intestinal uptake and onward movement. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 46, 185-252. doi: 10.1016/j.proghi.2011.11.001
- Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*. 91, 174-182. doi: 10.1016/j.watres.2016.01.002
- Carreras-Colom, E., Constenla, M., Soler-Membrives, A., Cartes, J.E., Baeza, M., Padrós, F., Carrassón, M., 2018. Spatial occurrence and effects of microplastic ingestion on the deep-water shrimp *Aristeus antennatus*. *Marine Pollution Bulletin*. 133, 44-52. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.012
- Catarino, A.I., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T.B., 2017. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 947-951. doi: 10.1002/etc.3608
- Catarino, A.I., Macchia, V., Sanderson, W.G., Thompson, R.C., Henry, T.B., 2018. Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. *Environmental Pollution*. 237, 675-684. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.069
- Ceccarini, A., Corti, A., Erba, F., Modugno, F., La Nasa, J., Bianchi, S., Castelvetro, V., 2018. The Hidden Microplastics: New Insights and Figures from the Thorough

- Separation and Characterization of Microplastics and of Their Degradation Byproducts in Coastal Sediments. *Environmental Science & Technology*. doi: 10.1021/acs.est.8b01487
- Chan, A.S., Horn, M.H., Dickson, K.A., Gawlicka, A., 2004. Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *Journal of Fish Biology*. 65, 848-858. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00495.x
- Chang, M., 2015. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 330-333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.10.074
- Chatain, M., 1998a. Matières thermoplastiques Introduction. Techniques de l'ingénieur Matières thermoplastiques : monographies. base documentaire : TIB147DUO.
- Chatain, M., 1998b. Matières thermodurcissables Introduction. Techniques de l'ingénieur Matières thermodurcissables : monographies. base documentaire : TIB146DUO.
- Chee, K.K., Wong, M.K., Lee, H.K., 1996. Microwave extraction of phthalate esters from marine sediment and soil. *Chromatographia*. 42, 378-384. doi: 10.1007/bf02272126
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*. 50, 5438-5453. doi: 10.1021/acs.est.5b05387
- Cheng, C.-Y., Liu, L.-L., Ding, W.-H., 2006. Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan. *Chemosphere*. 65, 2152-2159. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.017
- 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. *Environment International*. 57–58, 75-80. doi: 10.1016/j.envint.2013.04.005
- Cherif Lahimer, M., Ayed, N., Horriche, J., Belgaied, S., 2017. Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. 10, S1938-S1954. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.07.022
- Cheve, J., Le Noc, S., 2018. Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département d'Ille-et-Vilaine. Edition 2018. Disponible sur: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00441/55230/>, Accédé le: 14/06/2018
- Chiesa, L.M., Nobile, M., Malandra, R., Pessina, D., Panseri, S., Labella, G.F., Arioli, F., 2018. Food safety traits of mussels and clams: distribution of PCBs, PBDEs, OCPs, PAHs and PFASs in sample from different areas using HRMS-Orbitrap® and modified QuEChERS extraction followed by GC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-13. doi: 10.1080/19440049.2018.1434900
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A.B., 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*. 203, 321-333. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00630-5
- Choy, C.A., Drazen, J.C., 2013. Plastic for dinner? Observations of frequent debris ingestion by pelagic predatory fishes from the central North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*. 485, 155-163. doi: 10.3354/meps10342
- Chua, E.M., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P.D., Clarke, B.O., 2014. Assimilation of Polybrominated Diphenyl Ethers from Microplastics by the Marine Amphipod, *Allorchestes Compressa*. *Environmental Science & Technology*. 48, 8127-8134. doi: 10.1021/es405717z
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected

- organisms. Marine Pollution Bulletin. 70, 227-233. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.009
- 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. Marine Pollution Bulletin. 62, 2199-2204. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.06.030
- Cochran, W.G., 1952. The χ^2 Test of Goodness of Fit. Ann. Math. Statist. 23, 315-345. doi: 10.1214/aoms/1177729380
- Codina-Garcia, M., Militao, T., Moreno, J., Gonzalez-Solis, 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. Environmental Science & Technology. 49, 14625-14632. doi: 10.1021/acs.est.5b04099
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Marine Pollution Bulletin. 62, 2588-2597. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025
- 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*. Environmental Science & Technology. 49, 1130-1137. doi: 10.1021/es504525u
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Galloway, T.S., 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. Scientific Reports. 4, 4528. doi: 10.1038/srep04528
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. Environmental Science & Technology. 47, 6646-6655. doi: 10.1021/es400663f
- 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. Environmental Science & Technology. 50, 3239-3246. doi: 10.1021/acs.est.5b05905
- 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. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 69, 331-339. doi: 10.1007/s00244-015-0221-0
- Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., Das, K., Jauniaux, T., Parmentier, E., 2017a. Microplastics in livers of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*, L.). Environmental Pollution. 229, 1000-1005. doi: 10.1016/j.envpol.2017.07.089
- Collard, F., Gilbert, B., Eppe, G., Roos, L., Compère, P., Das, K., Parmentier, E., 2017b. Morphology of the filtration apparatus of three planktivorous fishes and relation with ingested anthropogenic particles. Marine Pollution Bulletin. 116, 189-191. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.067
- Collard, F., Gasperi, J., Gilbert, B., Eppe, G., Azimi, S., Rocher, V., Tassin, B., 2018. Anthropogenic particles in the stomach contents and liver of the freshwater fish *Squalius cephalus*. Science of The Total Environment. 643, 1257-1264. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.313
- Collignon, A., Hecq, J.-H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin. 64, 861-864. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.01.011
- Compa, M., Ventero, A., Iglesias, M., Deudero, S., 2018. Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus*

- (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin*. 128, 89-96. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.009
- Consolidated Regulation, 2008. Polybrominated Diphenyl Ethers Regulations (SOR/2008-218). Disponible sur: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/SOR-2008-218/>, Accédé le: 26/04/2017
- Corcoran, P.L., Biesinger, M.C., Grifi, M., 2009. Plastics and beaches: A degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 80-84. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.08.022
- Council Regulation, 1998. Council Regulation (EC) No 850/98 of 30 March 1998 for the conservation of fishery resources through technical measures for the protection of juveniles of marine organisms. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1998/850/2014-01-01>, Accédé le: 11/09/2018
- Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S.F., Narayanaswamy, B.E., 2017. Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*. 9, 1437-1445. doi: 10.1039/C6AY02343F
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Úbeda, 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
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111, 10239-10244. doi: 10.1073/pnas.1314705111
- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette Jr, L.J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*. 24, 225-239. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.05.008
- Cruz, R., Cunha, S.C., Casal, S., 2015. Brominated flame retardants and seafood safety: A review. *Environment International*. 77, 116-131. doi: 10.1016/j.envint.2015.01.001
- Dalmo, R.A., McQueen Leifson, R., Bøgwald, J., 1995. Microspheres as antigen carriers: studies on intestinal absorption and tissue localization of polystyrene microspheres in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 18, 87-91. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb01270.x
- 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*). *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 600-606. doi: 10.1007/s11356-011-0579-0
- David, A., Fenet, H., Gomez, E., 2009. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 953-960. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.04.021
- Davidson, K., Dudas, S.E., 2016. Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 71, 147-156. doi: 10.1007/s00244-016-0286-4
- Davison, P., Asch, R.G., 2011. Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*. 432, 173-180. doi: 10.3354/meps09142
- Dawson, A.L., Kawaguchi, S., King, C.K., Townsend, K.A., King, R., Huston, W.M., Bengtson Nash, S.M., 2018. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nature Communications*. 9, 1001. doi: 10.1038/s41467-018-03465-9

- de Boer, J., Wester, P.G., Klamer, H.J.C., Lewis, W.E., Boon, J.P., 1998. Do flame retardants threaten ocean life? *Nature*. 394, 28-29.
- de la Parra, A.M., Rosas, A., Lazo, J.P., Viana, M.T., 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33, 223-231. doi: 10.1007/s10695-007-9134-9
- de los Ríos, A., Juanes, J.A., Ortiz-Zarragoitia, M., López de Alda, M., Barceló, D., Cajaraville, M.P., 2012. Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis. *Marine Pollution Bulletin*. 64, 563-573. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.12.018
- De Mendiburu, F., 2014. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research*. R package version.
- 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. *Environmental Pollution*. 196, 359-362. doi: 10.1016/j.envpol.2014.10.026
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., Robbens, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*. 85, 146-155. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.06.006
- Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*. 215, 223-233. 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. *Environmental Pollution*. 186, 248-256. doi: 10.1016/j.envpol.2013.11.019
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*. 7, 46687. doi: 10.1038/srep46687
- Desforges, J.-P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*. 79, 94-99. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.035
- Desrosiers, V., Le François, N.R., Blier, P.U., 2008. Trypsin-Like Enzyme from Atlantic Wolffish (*Anarhichas lupus*) Viscera: Purification and Characterization. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 17, 11-26. doi: 10.1080/10498850801891124
- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 98, 179-187. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.06.051
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., Zeri, C., 2018. Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 135, 30-40. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.063
- Directive Strategy Framework, 2013. Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. Disponible sur: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC83985/lb-na-26113-en-n.pdf>, Accédé le: 11/08/2017
- do Sul, J.A.I., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*. 185, 352-364. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.036

- Dopico-García, M.S., López-Vilariño, J.M., González-Rodríguez, M.V., 2007. Antioxidant Content of and Migration from Commercial Polyethylene, Polypropylene, and Polyvinyl Chloride Packages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 3225-3231. doi: 10.1021/jf070102+
- Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., Tassin, B., 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*. 104, 290-293. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.01.006
- 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. *Environmental Chemistry*. 12, 592-599. doi: 10.1071/EN14167
- Duemichen, E., Braun, U., Senz, R., Fabian, G., Sturm, H., 2014. Assessment of a new method for the analysis of decomposition gases of polymers by a combining thermogravimetric solid-phase extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1354, 117-128. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.057
- Dümichen, E., Eisentraut, P., Bannick, C.G., Barthel, A.-K., Senz, R., Braun, U., 2017. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere*. 174, 572-584. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.010
- Dümichen, E., Barthel, A.-K., Braun, U., Bannick, C.G., Brand, K., Jekel, M., Senz, R., 2015. Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method. *Water Research*. 85, 451-457. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.002
- ECPI, 2016. Plasticisers. Disponible sur: http://www.plasticisers.org/en_GB/plasticisers, Accédé le: 24/11/2016
- El Mansouri, H., Yagoubi, N., Ferrier, D., 1998. Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. *Chromatographia*. 48, 491. doi: 10.1007/BF02466639
- Elert, A.M., Becker, R., Duemichen, E., Eisentraut, P., Falkenhagen, J., Sturm, H., Braun, U., 2017. Comparison of different methods for MP detection: What can we learn from them, and why asking the right question before measurements matters? *Environmental Pollution*. 231, 1256-1264. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.074
- Ellien, C., Thiébaud, E., Dumas, F., Salomon, J.-C., Nival, P., 2004. A modelling study of the respective role of hydrodynamic processes and larval mortality on larval dispersal and recruitment of benthic invertebrates: example of *Pectinaria koreni* (Annelida: Polychaeta) in the Bay of Seine (English Channel). *Journal of Plankton Research*. 26, 117-132. doi: 10.1093/plankt/fbh018
- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine Pollution Bulletin*. 100, 70-81. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.027
- Enders, K., Lenz, R., Beer, S., Stedmon, C.A., 2017. Extraction of microplastic from biota: recommended acidic digestion destroys common plastic polymers. *ICES Journal of Marine Science*. 74, 326-331. doi: 10.1093/icesjms/fsw173
- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 50, 1103-1114. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.04.030
- Engler, R.E., 2012. The Complex Interaction between Marine Debris and Toxic Chemicals in the Ocean. *Environmental Science & Technology*. 46, 12302-12315. doi: 10.1021/es3027105

- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., Amato, S., 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*. 77, 177-182. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.007
- Eriksen, M., Lebreton, L.C., 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.
- Eriksson, C., Burton, H., 2003. Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 32, 380-384. doi: 10.1579/0044-7447-32.6.380
- Erni-Cassola, G., Gibson, M.I., Thompson, R.C., Christie-Oleza, J.A., 2017. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 µm) in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*. 51, 13641-13648. doi: 10.1021/acs.est.7b04512
- Espinosa, C., Esteban, M.Á., Cuesta, A., 2016. Microplastics in Aquatic Environments and Their Toxicological Implications for Fish in Soloneski, S., Larramendy, M.L. (Eds.), *Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum*. InTech, pp. 220.
- European Bioplastics, 2016. What are bioplastics? Material types, terminology, and labels – an introduction. Disponible sur: http://docs.european-bioplastics.org/2016/publications/fs/EUBP_fs_what_are_bioplastics.pdf, Accédé le: 27/06/2018
- European Bioplastics, 2017. Bioplastics market data. Disponible sur: <http://www.european-bioplastics.org/market/>, Accédé le: 06/11/2017
- European Chemical Agency, 2017. REACH. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/regulations/reach>, Accédé le: 24/04/2017
- 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.
- European Commission, 2011. Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 1-6.
- European Commission, 2014. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=FR>, Accédé le: 06/07/2018
- European Commission, 2017. The EU fish market, 2017 Edition. Disponible sur: <https://www.eumofa.eu/the-eu-fish-market>, Accédé le: 08/06/2018
- European Council Decision, 2009. Official Journal of the European Union Commission. Decision 2005/717/EC-Exemption of Deca BDE from the prohibition on Use, C116. May 9, 2008. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A62006CJ0014>, Accédé le: 12/09/2016
- European Council Regulation, 2006. European Commission Regulation No.1907/2006 Concerning the Registration Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) establishing a European Chemicals Agency Amending Directive 1999/45/EC and Repealing Council Regulation (EEC) No.793/93 and Commission Regulation (EC) No.1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC 93/67/EEC 93/105/EC and 2000/21/EC. December 18, 2006. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1907-20140410&from=FR>, Accédé le: 12/09/2016

- European Council Regulation, 2011. European Commission Regulation No.10/2011 on Plastic Materials and Articles Intended to Come into Contact with Food. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R0010>, Accédé le: 14/09/2016
- European Directive, 2003. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromo-diphenyl ether). Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:042:0045:0046:EN:PDF>, Accédé le: 12/09/2016
- European Food Safety Authority, 2011a. Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in Food. EFSA Journal. 9. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2296
- European Food Safety Authority, 2011b. Scientific Opinion on Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food. EFSA Journal. 9. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2477
- European Food Safety Authority, 2012. Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food. EFSA Journal. 10. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2908
- Fabbri, D., Tartari, D., Trombini, C., 2000. Analysis of poly(vinyl chloride) and other polymers in sediments and suspended matter of a coastal lagoon by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 413, 3-11. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00766-2
- FAO, 2016. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département de la pêche et de l'aquaculture de la FAO, Rome, Italie, pp. 224 pages.
- FAO, 2018a. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département de la pêche et de l'aquaculture de la FAO, Rome, Italie.
- FAO, 2018b. Fisheries and Aquaculture Department. Disponible sur: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp_5540026089884534146.xml&outtype=html, Accédé le: 15/06/2018
- Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*. 177, 1-3. doi: 10.1016/j.envpol.2013.01.046
- 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. *Environmental Chemistry*. 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. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 1225-1228. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.04.025
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001. Distribution and Fate of Neutral Alkylphenol Ethoxylate Metabolites in a Sewage-Impacted Urban Estuary. *Environmental Science & Technology*. 35, 2428-2435. doi: 10.1021/es001871b
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., 2008. Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere*. 72, 1279-1285. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.060
- Filella, M., 2015. Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: methodological and conceptual aspects. *Environmental Chemistry*. 12, 527-538. doi: 10.1071/EN15012
- Fischer, M., Scholz-Böttcher, B.M., 2017. Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by

- Pyrolysis-Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*. 51, 5052-5060. doi: 10.1021/acs.est.6b06362
- Fischer, V., Elsner, N.O., Brenke, N., Schwabe, E., Brandt, A., 2015. Plastic pollution of the Kuril–Kamchatka Trench area (NW Pacific). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 111, 399-405. doi: 10.1016/j.dsr2.2014.08.012
- 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. *Environmental Science & Technology*. 47, 8818-8824. doi: 10.1021/es400931b
- Fok, L., Cheung, P., 2015. Hong Kong at the Pearl River estuary: A hotspot of microplastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*. 99, 112-118. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.050
- Fontanille, M., Gnanou, Y., 2014. *Chimie et physico-chimie des polymères*, Paris,
- 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*). *Marine Pollution Bulletin*. 64, 2374-2379. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.08.013
- Fossi, M.C., Coppola, D., Bains, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., Panti, C., de Sabata, E., Clò, 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*). *Marine environmental research*. 100, 17-24. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.02.002
- Fossi, M.C., Marsili, L., Bains, 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. *Environmental Pollution*. 209, 68-78. doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.022
- 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. *Environmental Science & Technology*. 50, 10988-10996. doi: 10.1021/acs.est.6b02720
- Fouyer, K., Lavastre, O., Rondeau, D., 2012. Direct Monitoring of the Role Played by a Stabilizer in a Solid Sample of Polymer Using Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry: The Case of Irgafos 168 in Polyethylene. *Analytical Chemistry*. 84, 8642-8649. doi: 10.1021/ac301759q
- FranceAgriMer, 2017. *Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2016*, France, pp. 128 pages.
- Frère, L., Paul-Pont, I., Moreau, J., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., Rinnert, E., 2016. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin*. 113, 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
- Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.-T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 15, 1949-1956. doi: 10.1039/C3EM00214D

- Frydkjær, C.K., Iversen, N., Roslev, P., 2017. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. doi: 10.1007/s00128-017-2186-3
- Fu, M., Li, Z., Gao, H., 2007. Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere*. 69, 1009-1016. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.04.061
- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezainé, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*. 250, 391-398. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.017
- Galgani, F., Souplet, A., Cadiou, Y., 1996. Accumulation of debris on the deep sea floor off the French Mediterranean coast. *Marine Ecology Progress Series*. 142, 225-234.
- Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin*. 92, 170-179. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.041
- Galloway, T.S., 2015. Micro- and Nano-plastics and Human Health in Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 343-366.
- Galloway, T.S., Cole, M., Lewis, C., 2017. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*. 1, 0116. doi: 10.1038/s41559-017-0116
- Gandara e Silva, P.P., Nobre, C.R., Resaffe, P., Pereira, C.D.S., Gusmão, F., 2016. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. *Water Research*. 106, 364-370. doi: 10.1016/j.watres.2016.10.016
- Garde, J.A., Catalá, R., Gavara, R., 1998. Global and Specific Migration of Antioxidants from Polypropylene Films into Food Simulants. *Journal of Food Protection*. 61, 1000-1006. doi: 10.4315/0362-028x-61.8.1000
- Gassel, M., Harwani, S., Park, J.-S., Jahn, A., 2013. Detection of nonylphenol and persistent organic pollutants in fish from the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*. 73, 231-242. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.05.014
- Gauquie, J., Devriese, L., Robbens, J., De Witte, B., 2015. A qualitative screening and quantitative measurement of organic contaminants on different types of marine plastic debris. *Chemosphere*. 138, 348-356. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.029
- Gaylor, M.O., Harvey, E., Hale, R.C., 2012. House crickets can accumulate polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) directly from polyurethane foam common in consumer products. *Chemosphere*. 86, 500-505. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.10.014
- GESAMP, 2017. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment, pp. 96p.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3. doi: 10.1126/sciadv.1700782
- Giam, C., Chan, H., Neff, G., Atlas, E., 1978. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. *Science*. 199, 419-421. doi: 10.1126/science.413194
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environmental Science: Nano*. 3, 346-350. doi: 10.1039/C6EN00008H
- Gigault, J., ter Halle, A., Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution*. 235, 1030-1034. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.024
- Gillet, P., Mouloud, M., Durou, C., Deutsch, B., 2008. Response of *Nereis diversicolor* population (Polychaeta, Nereididae) to the pollution impact – Authie and Seine

- estuaries (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 76, 201-210. doi: 10.1016/j.ecss.2007.07.004
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 6, 111. doi: 10.1016/0025-326X(75)90271-4
- Goldstein, M.C., Goodwin, D.S., 2013. Gooseneck barnacles (*Lepas* spp.) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. *PeerJ*. 1, e184.
- Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. *Biology Letters*.
- González, N., Fernández-Berridi, M.J., 2006. Application of Fourier transform infrared spectroscopy in the study of interactions between PVC and plasticizers: PVC/plasticizer compatibility versus chemical structure of plasticizer. *J Appl Polym Sci*. 101, 1731-1737. doi: doi:10.1002/app.23381
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. *Environmental Science & Technology*. 45, 1466-1472. doi: 10.1021/es1032025
- Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 368, 22-29. doi: 10.1016/j.jembe.2008.09.007
- Grangeré, K., Ménesguen, A., Lefebvre, S., Bacher, C., Pouvreau, S., 2009. Modelling the influence of environmental factors on the physiological status of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in an estuarine embayment; The Baie des Veys (France). *Journal of Sea Research*. 62, 147-158. doi: 10.1016/j.seares.2009.02.002
- Gray, A.D., Weinstein, J.E., 2017. Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36, 3074-3080. doi: 10.1002/etc.3881
- Green, D.S., Boots, B., Sigwart, J., Jiang, S., Rocha, C., 2016. Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environmental Pollution*. 208, 426-434. doi: 10.1016/j.envpol.2015.10.010
- Gregory, M.R., 1978. Accumulation and distribution of virgin plastic granules on New Zealand beaches. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 12, 399-414. doi: 10.1080/00288330.1978.9515768
- Gregory, M.R., 1996. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. *Marine Pollution Bulletin*. 32, 867-871. doi: 10.1016/S0025-326X(96)00047-1
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*. 272, 55-75. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.062
- Grigorakis, S., Mason, S.A., Drouillard, K.G., 2017. Determination of the gut retention of plastic microbeads and microfibers in goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*. 169, 233-238. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.055
- Grove, D., Loizides, L., Nott, J., 1978. Satiation amount, frequency of feeding and gastric emptying rate in *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology*. 12, 507-516.
- Güven, O., Gökdağ, K., Jovanović, B., Kıdeys, A.E., 2017. Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution*. 223, 286-294. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.025
- Hadjmohammadi, M.R., Fatemi, M.H., Taneh, T., 2011. Coacervative extraction of phthalates from water and their determination by high performance liquid chromatography. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 8, 100-106. doi: 10.1007/bf03246206

- Hale, R.C., 2018. Are the Risks from Microplastics Truly Trivial? *Environmental Science & Technology*. 52, 931-931. doi: 10.1021/acs.est.7b06615
- Hamilton, K., 2011. Ussing's "Little Chamber": 60 Years+ Old and Counting. *Frontiers in Physiology*. 2. doi: 10.3389/fphys.2011.00006
- Hamlin, H.J., Marciano, K., Downs, C.A., 2015. Migration of nonylphenol from food-grade plastic is toxic to the coral reef fish species *Pseudochromis fridmani*. *Chemosphere*. 139, 223-228. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.032
- Hammond, M., Nunn, H., Rogers, G., Lee, H., Marghitoiu, A.-L., Perez, L., Nashed-Samuel, Y., Anderson, C., Vandiver, M., Kline, S., 2013. Identification of a Leachable Compound Detrimental to Cell Growth in Single-Use Bioprocess Containers. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 67, 123-134. doi: 10.5731/pdajpst.2013.00905
- Hansen, E., Nilsson, N., Lithner, D., Lassen, C., 2013. Hazardous substances in plastic materials. Disponible sur: <http://www.miljodirektoratet.no/old/klif/publikasjoner/3017/ta3017.pdf>, Accédé le: 22/11/2016
- Hao, P.T., Ismail, H., Hashim, A.S., 2001. Study of two types of styrene butadiene rubber in tire tread compounds. *Polymer Testing*. 20, 539-544. doi: 10.1016/S0142-9418(00)00073-8
- Hendrickson, E., Minor, E.C., Schreiner, K., 2018. Microplastic Abundance and Composition in Western Lake Superior As Determined via Microscopy, Pyr-GC/MS, and FTIR. *Environmental Science & Technology*. 52, 1787-1796. doi: 10.1021/acs.est.7b05829
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*. 182, 781-793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.096
- Hermabessiere, L., Himber, C., Boricaud, B., Kazour, M., Amara, R., Cassone, A.-L., Laurentie, M., Paul-Pont, I., Soudant, P., Dehaut, A., Duflos, G., 2018. Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 6663-6676. doi: 10.1007/s00216-018-1279-0
- Hermesen, E., Pompe, R., Besseling, E., Koelmans, A.A., 2017. Detection of low numbers of microplastics in North Sea fish using strict quality assurance criteria. *Marine Pollution Bulletin*. 122, 253-258. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.051
- Hermesen, E., Mintenig, S., Besseling, E., Koelmans, A.A., 2018. Quality Criteria for the Analysis of Microplastic in Biota Samples. Critical review. *Environmental Science & Technology*. doi: 10.1021/acs.est.8b01611
- Herrmann, J.R., Turner, J.R., 2016. Beyond Ussing's chambers: contemporary thoughts on integration of transepithelial transport. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 310, C423-C431. doi: 10.1152/ajpcell.00348.2015
- 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. *Environmental Science & Technology*. 50, 1924-1933. doi: 10.1021/acs.est.5b04663
- Hintersteiner, I., Himmelsbach, M., Buchberger, W.W., 2015. Characterization and quantitation of polyolefin microplastics in personal-care products using high-temperature gel-permeation chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407, 1253-1259. doi: 10.1007/s00216-014-8318-2

- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1683-1692. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.06.004
- Höfer, R., 2012. Processing and Performance Additives for Plastics. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, ed. K. Matyjaszewski and M. Möller. 10.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *The Journal of nutrition*. 118, 515-520.
- Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution*. 160, 42-48. doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.052
- Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2014. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Marine Chemistry*. 167, 25-32. doi: 10.1016/j.marchem.2014.06.001
- Hong, S.H., Shim, W.J., Hong, L., 2017. Methods of analysing chemicals associated with microplastics: a review. *Analytical Methods*. 9, 1361-1368. doi: 10.1039/C6AY02971J
- Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 2115-2126. doi: 10.1098/rstb.2008.0311
- Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci Total Environ*. 586, 127-141. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.190
- Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. Disponible sur: <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E00.HTM#Contents>, Accédé le: 19/07/2018
- Hussain, N., Jaitley, V., Florence, A.T., 2001. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 50, 107-142. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00152-1
- Huvet, A., Paul-Pont, I., Fabioux, C., Lambert, C., Suquet, M., Thomas, Y., Robbens, J., Soudant, P., Sussarellu, R., 2016. Reply to Lenz et al.: Quantifying the smallest microplastics is the challenge for a comprehensive view of their environmental impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113, E4123.
- Ibrahim, S.F., van den Engh, G., 2007. Flow Cytometry and Cell Sorting in Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (Eds.), *Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 19-39.
- ICIS, 2003. Product profile: Bisphenol A. Disponible sur: <http://www.icis.com/resources/news/2003/04/24/193606/product-profile-bisphenol-a/>, Accédé le: 16/09/2016
- Ifremer, 2011. Biologie Merlan. Disponible sur: <https://wwz.ifremer.fr/peche/content/download/38111/521120/file/merlanbio.pdf?version=1>, Accédé le: 04/06/2018
- Ifremer, 2018. Les tailles minimales. Poissons Manche, Mer du Nord, Mer Celtique. Disponible sur: <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/La-gestion/combien/Les-tailles-minimales/Poissons-Manche-Mer-du-Nord-Mer-Celtique>, Accédé le: 12/06/2018

- Iglesias, J.I.P., Navarro, E., Alvarez Jorna, P., Armentina, I., 1992. Feeding, particle selection and absorption in cockles *Cerastoderma edule* (L.) exposed to variable conditions of food concentration and quality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 162, 177-198. doi: 10.1016/0022-0981(92)90200-T
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 18, 59-69.
- 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 Oceanogr Methods*. 10, 524-537. doi: 10.4319/lom.2012.10.524
- 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 Research*. 98, 64-74. doi: 10.1016/j.watres.2016.03.015
- Industrievereinigung Chemiefaser, 2013. Man-made fibers. Disponible sur: <https://www.ivc-ev.de/>, Accédé le: 22/12/2016
- Iñiguez, M.E., Conesa, J.A., Fullana, A., 2017. Microplastics in Spanish Table Salt. *Scientific Reports*. 7, 8620. doi: 10.1038/s41598-017-09128-x
- INSEE, 2015a. Comparateur de territoire, Intercommunalité-Métropole de CA du Boulonnais (246200729). Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=EPCI-246200729>, Accédé le: 28/05/2018
- INSEE, 2015b. Cinquante ans de consommation alimentaire : une croissance modérée, mais de profonds changements. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1379769>, Accédé le: 27/06/2018
- International Organization for Standardization (ISO), 1994. 5725-3: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization (ISO), 2015. TS 80004-2:2015. Nanotechnologies -- Vocabulaire -- Partie 2: Nano-objets. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/54440.html>, Accédé le: 25/07/2018
- International Pellet Watch, 2017. Global Monitoring of POPs using Beached Plastic Resin Pellets. Disponible sur: <http://www.pelletwatch.org/>, Accédé le: 15/11/2017
- ISO/IEC Guide 98-3, 2008. Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). 130.
- Isobe, A., Uchida, K., Tokai, T., Iwasaki, S., 2015. East Asian seas: A hot spot of pelagic microplastics. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 618-623. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.10.042
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001. Distribution and Behavior of Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol Monoethoxylate in Tokyo Metropolitan Area: Their Association with Aquatic Particles and Sedimentary Distributions. *Environmental Science & Technology*. 35, 1041-1049. doi: 10.1021/es001250i
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., 2007. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environmental Monitoring and Assessment*. 135, 423-440. doi: 10.1007/s10661-007-9661-y
- IUPAC, 2006. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), 0-9678550-9-8

- Ivleva, N.P., Wiesheu, A.C., Niessner, R., 2016. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angew Chem Int Ed.* 56, 1720-1739. doi: 10.1002/anie.201606957
- 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. *Environmental Science & Technology.* 50, 4951-4960. doi: 10.1021/acs.est.5b05485
- Jantz, L.A., Morishige, C.L., Bruland, G.L., Lepczyk, C.A., 2013. Ingestion of plastic marine debris by longnose lancetfish (*Alepisaurus ferox*) in the North Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin.* 69, 97-104. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.01.019
- Johansson, I., Héas-Moisan, K., Guiot, N., Munsch, C., Tronczyński, J., 2006. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels from selected French coastal sites: 1981–2003. *Chemosphere.* 64, 296-305. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.014
- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M., de Voogt, P., 2003. Fate of Nonylphenol Ethoxylates and Their Metabolites in Two Dutch Estuaries: Evidence of Biodegradation in the Field. *Environmental Science & Technology.* 37, 321-327. doi: 10.1021/es020121u
- Jungnickel, H., Pund, R., Tentschert, J., Reichardt, P., Laux, P., Harbach, H., Luch, A., 2016. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)-based analysis and imaging of polyethylene microplastics formation during sea surf simulation. *Science of The Total Environment.* 563, 261-266. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.025
- Kalogeropoulos, N., Karavoltos, S., Sakellari, A., Avramidou, S., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2012. Heavy metals in raw, fried and grilled Mediterranean finfish and shellfish. *Food and Chemical Toxicology.* 50, 3702-3708. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.012
- Kannan, N., Yamashita, N., Petrick, G., Duinker, J.C., 1998. Polychlorinated Biphenyls and Nonylphenols in the Sea of Japan. *Environmental Science & Technology.* 32, 1747-1753. doi: 10.1021/es970713q
- Käppler, A., Fischer, M., Scholz-Böttcher, B.M., Oberbeckmann, S., Labrenz, M., Fischer, D., Eichhorn, K.-J., Voit, B., 2018. Comparison of μ -ATR-FTIR spectroscopy and py-GCMS as identification tools for microplastic particles and fibers isolated from river sediments. *Anal Bioanal Chem.* doi: 10.1007/s00216-018-1185-5
- Karami, A., Golieskardi, A., Ho, Y.B., Larat, V., Salamatinia, B., 2017a. Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish. *Scientific Reports.* 7, 5473. doi: 10.1038/s41598-017-05828-6
- Karami, A., Golieskardi, A., Keong Choo, C., Larat, V., Galloway, T.S., Salamatinia, B., 2017b. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. 7, 46173. doi: 10.1038/srep46173
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B., Salamatinia, B., 2017c. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of The Total Environment.* 578, 485-494. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.213
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Larat, V., Karbalaei, S., Salamatinia, B., 2018. Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of The Total Environment.* 612, 1380-1386. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.005
- Karl, H., Numata, J., Lahrssen-Wiederholt, M., 2018. Variability of fat, water and protein content in the flesh of beaked redfish (*Sebastes mentella*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) from arctic fishing grounds. *Journal of Consumer Protection and Food Safety.* doi: 10.1007/s00003-018-1160-2
- 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. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 9, 359-365. doi: 10.1007/s00003-014-0907-7
- Kartar, S., Milne, R.A., Sainsbury, M., 1973. Polystyrene waste in the Severn Estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 4, 144. doi: 10.1016/0025-326X(73)90010-6
- Kartar, S., Abou-Seedo, F., Sainsbury, M., 1976. Polystyrene spherules in the Severn Estuary—a progress report. *Marine Pollution Bulletin*. 7, 52. doi: 10.1016/0025-326X(76)90092-8
- Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., Suzuki, A., 2004. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan—within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere*. 55, 1519-1527. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.01.032
- Ke, C.-L., Gu, Y.-G., Liu, Q., Li, L.-D., Huang, H.-H., Cai, N., Sun, Z.-W., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine organisms from South China Sea: Occurrence, sources, and human health implications. *Marine Pollution Bulletin*. 117, 507-511. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.018
- Keil, R., Salemme, K., Forrest, B., Neibauer, J., Logsdon, M., 2011. Differential presence of anthropogenic compounds dissolved in the marine waters of Puget Sound, WA and Barkley Sound, BC. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2404-2411. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.08.029
- Kenyon, K.W., Kridler, E., 1969. Laysan Albatrosses Swallow Indigestible Matter. *The Auk*. 86, 339-343. doi: 10.2307/4083505
- Keswani, A., Oliver, D.M., Gutierrez, T., Quilliam, R.S., 2016. Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Marine environmental research*. 118, 10-19. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.04.006
- Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., Chan, W.C.W., 2010. Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*. 363, 2434-2443. doi: 10.1056/NEJMra0912273
- Kirstein, I.V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., Gerdt, G., 2016. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine environmental research*. 120, 1-8. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.07.004
- Klamer, H.J.C., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., Villerius, L.A., Åkerman, J.E., Bakker, J.F., 2005. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. *Chemosphere*. 58, 1579-1587. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.027
- Klein, S., Dimzon, I.K., Eubeler, J., Knepper, T.P., 2018. Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment, *Freshwater Microplastics*. Springer, pp. 51-67.
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Foekema, E.M., 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution*. 187, 49-54. doi: 10.1016/j.envpol.2013.12.013
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the Aquatic Environment. *Critical Review in Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 325-340.
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., 2013a. Correction to Plastic As a Carrier of POPs to Aquatic Organisms: A Model Analysis. *Environmental Science & Technology*. 47, 8992-8993. doi: 10.1021/es403018h
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., 2013b. Plastic as a Carrier of POPs to Aquatic Organisms: A Model Analysis. *Environmental Science & Technology*. 47, 7812-7820. doi: 10.1021/es401169n

- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environmental Science & Technology*. 50, 3315-3326. doi: 10.1021/acs.est.5b06069
- Kožul, D., Herceg Romanić, S., Kljaković-Gašpić, Z., Veža, J., 2009. Levels of Organochlorine Compounds in the Mediterranean Blue Mussel from the Adriatic Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83, 880. doi: 10.1007/s00128-009-9833-2
- Kripa, V., Nair, P.G., Dhanya, A., Pravitha, V., Abhilash, K., Mohammed, A.A., Vijayan, D., Vishnu, P., Mohan, G., Anilkumar, P., 2014. Microplastics in the gut of anchovies caught from the mud bank area of Alappuzha, Kerala. *Marine Fisheries Information Service; Technical and Extension Series*, 27-28.
- Kühn, S., van Werven, B., van Oyen, A., Meijboom, A., Bravo Rebolledo, E.L., van Franeker, J.A., 2017. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 115, 86-90. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.034
- Kühn, S., Schaafsma, F.L., van Werven, B., Flores, H., Bergmann, M., Egelkraut-Holtus, M., Tekman, M.B., van Franeker, J.A., 2018. Plastic ingestion by juvenile polar cod (*Boreogadus saida*) in the Arctic Ocean. *Polar Biology*. doi: 10.1007/s00300-018-2283-8
- Kurihara, R., Watanabe, E., Ueda, Y., Kakuno, A., Fujii, K., Shiraishi, F., Hashimoto, S., 2007. Estrogenic activity in sediments contaminated by nonylphenol in Tokyo Bay (Japan) evaluated by vitellogenin induction in male mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Marine Pollution Bulletin*. 54, 1315-1320. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.06.007
- Kusch, P., 2016. Application of Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Py-GC/MS) in Rocha-Santos, T., Duarte, A. (Eds.), *Characterization and Analysis of Microplastics*. Elsevier, pp. 306.
- 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. *Journal of Chromatography A*. 1349, 1-10. doi: 10.1016/j.chroma.2014.04.094
- Lacroix, C., Duvieilbourg, E., Guillou, N., Guyomarch, J., Bassoulet, C., Moraga, D., Chapalain, G., Auffret, M., 2017. Seasonal monitoring of blue mussel (*Mytilus spp.*) populations in a harbor area: A focus on responses to environmental factors and chronic contamination. *Marine environmental research*. 129, 24-35. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.04.008
- 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. *Environmental Pollution*. 215, 331-339. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.006
- Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Trznadel, M., Trunkfield, L.A., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Paull, G.C., Wilson, R.J., Mill, J., Santos, E.M., 2016. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics*. 11, 526-538. doi: 10.1080/15592294.2016.1182272
- Laist, D.W., 1987. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 18, 319-326. doi: 10.1016/S0025-326X(87)80019-X

- Lambert, S., Wagner, M., 2016a. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere*. 161, 510-517. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.042
- Lambert, S., Wagner, M., 2016b. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere*. 145, 265-268. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.078
- 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
- Lau, O.-W., Wong, S.-K., 2000. Contamination in food from packaging material. *Journal of Chromatography A*. 882, 255-270. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00356-3
- Law, R., Fileman, T., Matthiessen, P., 1991. Phthalate esters and other industrial organic chemicals in the North and Irish Seas. *Water Science and Technology*. 24, 127-134.
- Leblanc, J.-C.V., Jean-Luc; Sirot, Véronique; Bemrah-Aouachria, Nawel 2006. Etude des Consommations Alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, Polluants et Oméga 3. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER-Ra-Calipso.pdf>, Accédé le: 29/08/2018
- Lebreton, L.C.M., van der Zwet, J., Damsteeg, J.-W., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J., 2017. River plastic emissions to the world's oceans. *Nature Communications*. 8, 15611. doi: 10.1038/ncomms15611
- Lee, K.-W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.-H., 2013. Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Science & Technology*. 47, 11278-11283. doi: 10.1021/es401932b
- Legifrance, 2017. Décret n° 2017-291. Disponible sur: www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000034154540&categorieLien=id, Accédé le: 20/03/2018
- LegiFrance, 2018. Arrêté du 26 octobre 2012 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000026582115>, Accédé le: 27/05/2018
- Lenz, R., Enders, K., Nielsen, T.G., 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113, E4121.
- Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C.A., Mackenzie, D.M.A., Nielsen, T.G., 2015. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine Pollution Bulletin*. 100, 82-91. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.026
- Leslie, H.A., Brandsma, S.H., van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D., 2017. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International*. 101, 133-142. doi: 10.1016/j.envint.2017.01.018
- Lewis, A.P., 2005. Organic Colorants, Coloring of Plastics.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N., 2008. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere*. 71, 1162-1172. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.023
- Li, H.-X., Getzinger, G.J., Ferguson, P.L., Orihuela, B., Zhu, M., Rittschof, D., 2016a. Effects of Toxic Leachate from Commercial Plastics on Larval Survival and Settlement of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Environmental Science & Technology*. 50, 924-931. doi: 10.1021/acs.est.5b02781

- Li, H.-X., Ma, L.-S., Lin, L., Ni, Z.-X., Xu, X.-R., Shi, H.-H., Yan, Y., Zheng, G.-M., Rittschof, D., 2018a. Microplastics in oysters *Saccostrea cucullata* along the Pearl River Estuary, China. *Environmental Pollution*. 236, 619-625. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.083
- Li, J., Liu, H., Paul Chen, J., 2018b. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*. 137, 362-374. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.056
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., Shi, H., 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*. 207, 190-195. doi: 10.1016/j.envpol.2015.09.018
- Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H., Rotchell, J.M., 2018c. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental Pollution*. 241, 35-44. doi: 10.1016/j.envpol.2018.05.038
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., Shi, H., 2016b. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*. 214, 177-184. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.012
- Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., 2016c. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Sci Total Environ*. 566–567, 333-349. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.084
- Liboiron, M., Liboiron, F., Wells, E., Richárd, N., Zahara, A., Mather, C., Bradshaw, H., Murichi, J., 2016. Low plastic ingestion rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland destined for human consumption collected through citizen science methods. *Marine Pollution Bulletin*. 113, 428-437. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.043
- Liebezeit, G., Liebezeit, E., 2013. Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 30, 2136-2140. doi: 10.1080/19440049.2013.843025
- Liebezeit, G., Liebezeit, E., 2014. Synthetic particles as contaminants in German beers. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 31, 1574-1578. doi: 10.1080/19440049.2014.945099
- Lithner, D., Larsson, Å., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment*. 409, 3309-3324. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.04.038
- Lithner, D., Nordensvan, I., Dave, G., 2012. Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile–butadiene–styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 1763-1772. doi: 10.1007/s11356-011-0663-5
- Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 74, 1195-1200. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.022
- 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. *Veterinary Parasitology*. 191, 276-283. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.015
- Löder, M.G.J., Gerds, 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, Cham, pp. 201-227.
- Löder, M.G.J., Imhof, H.K., Ladehoff, M., Löschel, L.A., Lorenz, C., Mintenig, S., Piehl, S., Pimpke, S., Schrank, I., Laforsch, C., Gerds, G., 2017. Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*. 51, 14283-14292. doi: 10.1021/acs.est.7b03055

- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., Soudant, P., 2015. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Marine Chemistry*. 175, 39-46. doi: 10.1016/j.marchem.2015.04.003
- Long, M., Paul-Pont, I., Hégaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environmental Pollution*. 228, 454-463. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.047
- Lots, F.A.E., Behrens, P., Vijver, M.G., Horton, A.A., Bosker, T., 2017. A large-scale investigation of microplastic contamination: Abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. *Mar Pollut Bull*. 123, 219-226. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.057
- Løvmo, S.D., Speth, M.T., Repnik, U., Koppang, E.O., Griffiths, G.W., Hildahl, J.P., 2017. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system. *Developmental & Comparative Immunology*. 67, 508-518. doi: 10.1016/j.dci.2016.06.016
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A., 2004. Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 2016-2020. doi: 10.1021/jf0345696
- 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. *Environmental Science & Technology*. 50, 4054-4060. 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, Cham, pp. 245-307.
- Lusher, A., McHugh, M., Thompson, R., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*. 67, 94-99. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.11.028
- Lusher, A.L., Hollman, P.C.H., Mendoza-Hill, J.J., 2017a. Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. in: 615, F.a.A.T.P.N. (Ed.). FAO, Rome, Italy.
- Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin*. 88, 325-333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.08.023
- Lusher, A.L., Tirelli, V., O'Connor, I., Officer, R., 2015a. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports*. 5, 14947. doi: 10.1038/srep14947
- Lusher, A.L., O'Donnell, C., Officer, R., O'Connor, I., 2015b. Microplastic interactions with North Atlantic mesopelagic fish. *ICES Journal of Marine Science*. doi: 10.1093/icesjms/fsv241
- Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., Cole, M., 2017b. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*. 9, 1346-1360. doi: 10.1039/c6ay02415g
- Lusher, A.L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., Officer, R., 2015c. Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: The True's beaked whale *Mesoplodon mirus*. *Environmental Pollution*. 199, 185-191. doi: 10.1016/j.envpol.2015.01.023
- 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. *Environmental Science & Technology*. 38, 2011-2020. doi: 10.1021/es034745r
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., Mayes, A.G., 2017. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*. 7, 44501. doi: 10.1038/srep44501
- Maher, W., Krikowa, F., Wruck, D., Louie, H., Nguyen, T., Huang, W.Y., 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. *Analytica Chimica Acta*. 463, 283-293. doi: 10.1016/S0003-2670(02)00346-X
- Majewsky, M., Bitter, H., Eiche, E., Horn, H., 2016. Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of The Total Environment*. 568, 507-511. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.017
- Mani, T., Hauk, A., Walter, U., Burkhardt-Holm, P., 2015. Microplastics profile along the Rhine River. *Scientific Reports*. 5, 17988. doi: 10.1038/srep17988
- Marcato, B., Guerra, S., Vianello, M., Scalia, S., 2003. Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*. 257, 217-225. doi: 10.1016/S0378-5173(03)00143-1
- Mason, S.A., Welch, V., Neratko, J., 2018. Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. Disponible sur: <https://orbmedia.org/sites/default/files/FinalBottledWaterReport.pdf>, Accédé le: 27/03/2018
- 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. *Environmental Pollution*. 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. *Marine Pollution Bulletin*. 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. *Environmental Science & Technology*. 35, 318-324. doi: 10.1021/es0010498
- Maulvault, A.L., Cardoso, C., Nunes, M.L., Marques, A., 2013. Risk-benefit assessment of cooked seafood: Black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) and edible crab (*Cancer pagurus*) as case studies. *Food Control*. 32, 518-524. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.026
- 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. *Marine environmental research*. 112, Part A, 78-85. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009
- McGoran, A.R., Clark, P.F., Morritt, D., 2017. Presence of microplastic in the digestive tracts of European flounder, *Platichthys flesus*, and European smelt, *Osmerus eperlanus*, from the River Thames. *Environmental Pollution*. 220, 744-751. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.078
- McGuffin, V.L., 2004. Theory of chromatography, *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, pp. 1-93.

- Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H., 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 2097-2113. doi: 10.1098/rstb.2008.0268
- Ménard, O., Dupont, D., 2014. Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovations Agronomiques*. 36, 27-41. doi: hal-01209654
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Determination of alpha-amylase by a microtechnic, *Annales de biologie clinique*, pp. 133.
- Michielssen, M.R., Michielssen, E.R., Ni, J., Duhaim, M.B., 2016. Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2, 1064-1073. doi: 10.1039/C6EW00207B
- Miller, M.E., Kroon, F.J., Motti, C.A., 2017. Recovering microplastics from marine samples: A review of current practices. *Marine Pollution Bulletin*. 123, 6-18. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.058
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*. 5, 1113-1124. doi: 10.1039/C3FO60702J
- Mintenig, S.M., Int-Veen, I., Löder, M.G.J., Primpke, S., Gerdt, G., 2017. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research*. 108, 365-372. doi: 10.1016/j.watres.2016.11.015
- Mintenig, S.M., Bauerlein, P., Koelmans, A.A., Dekker, S.C., van Wezel, A., 2018. Closing the gap between small and smaller: Towards a framework to analyse nano- and microplastics in aqueous environmental samples. *Environmental Science: Nano*. doi: 10.1039/C8EN00186C
- Moon, H.-B., Kannan, K., Choi, M., Choi, H.-G., 2007a. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine sediments from industrialized bays of Korea. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 1402-1412. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.05.024
- Moon, H.-B., Kannan, K., Lee, S.-J., Choi, M., 2007b. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and bivalves from Korean coastal waters. *Chemosphere*. 66, 243-251. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.025
- Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*. 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. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 1297-1300. doi: 10.1016/S0025-326X(01)00114-X
- Morris, S., Allchin, C.R., Zegers, B.N., Haftka, J.J.H., Boon, J.P., Belpaire, C., Leonards, P.E.G., van Leeuwen, S.P.J., de Boer, J., 2004. Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Brominated Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs. *Environmental Science & Technology*. 38, 5497-5504. doi: 10.1021/es049640i
- Munno, K., Helm, P.A., Jackson, D.A., Rochman, C., Sims, A., 2018. Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37, 91-98. doi: 10.1002/etc.3935

- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*. 50, 5800-5808. doi: 10.1021/acs.est.5b05416
- Murphy, F., Russell, M., Ewins, C., Quinn, B., 2017. The uptake of macroplastic & microplastic by demersal & pelagic fish in the Northeast Atlantic around Scotland. *Marine Pollution Bulletin*. 122, 353-359. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.073
- Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1207-1217. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.032
- Nadal, M.A., Alomar, C., Deudero, S., 2016. High levels of microplastic ingestion by the semipelagic fish bogue *Boops boops* (L.) around the Balearic Islands. *Environmental Pollution*. 214, 517-523. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.054
- Naidoo, T., Glassom, D., Smit, A.J., 2015. Plastic pollution in five urban estuaries of KwaZulu-Natal, South Africa. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 473-480. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.044
- Naidoo, T., Goordiyal, K., Glassom, D., 2017. Are Nitric Acid (HNO₃) Digestions Efficient in Isolating Microplastics from Juvenile Fish? *Water, Air, & Soil Pollution*. 228, 470. doi: 10.1007/s11270-017-3654-4
- Napper, I.E., Thompson, R.C., 2016. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Marine Pollution Bulletin*. 112, 39-45. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.025
- Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin*. 99, 178-185. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.029
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A., 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*. 233, 305-320. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.08.012
- Nel, H., Froneman, P., 2015. A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 274-279. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.043
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015. Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environmental Science & Technology*. 49, 4019-4035. doi: 10.1021/es505233b
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J.L., Pereira, T., 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 119-126. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.008
- Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 52, 761-767. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.11.017
- Nizzetto, L., Futter, M., Langaas, S., 2016. Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin? *Environmental Science & Technology*. 50, 10777-10779. doi: 10.1021/acs.est.6b04140
- Norén, F., 2007. Small plastic particles in Coastal Swedish waters. KIMO Sweden.
- Nuelle, M.-T., Dekiff, J.H., Remy, D., Fries, E., 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*. 184, 161-169. doi: 10.1016/j.envpol.2013.07.027
- 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. *Earth's Future*. 2, 315-320. doi: 10.1002/2014EF000240

- OECD, 2004. Emission scenario document on plastic additives. Series on emission scenario documents, no. 3. Paris: Environmental directorate, OECD Environmental Health and Safety Publications. Disponible sur: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=ENV/JM/MONO%282004%298/REV1>, Accédé le: 15/06/2016
- Oehlmann, J., Oetken, M., Schulte-Oehlmann, U., 2008. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research*. 108, 140-149. doi: 10.1016/j.envres.2008.07.016
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 364, 2047-2062. doi: 10.1098/rstb.2008.0242
- Ohiozebau, E., Tendler, B., Codling, G., Kelly, E., Giesy, J.P., Jones, P.D., 2017. Potential health risks posed by polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle tissues of fishes from the Athabasca and Slave Rivers, Canada. *Environmental Geochemistry and Health*. 39, 139-160. doi: 10.1007/s10653-016-9815-3
- 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). *Ecological Indicators*. 34, 641-647. doi: 10.1016/j.ecolind.2013.06.019
- Olsson, C., Aldman, G., Larsson, A., Holmgren, S., 1999. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology*. 202, 161-170.
- Ory, N.C., Sobral, P., Ferreira, J.L., Thiel, M., 2017. Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Science of The Total Environment*. 586, 430-437. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.175
- 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. Disponible sur: http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Advice/2015/Special_Requests/OSPAR_PLAST_advice.pdf, Accédé le: 15/11/2016
- Oßmann, B.E., Sarau, G., Schmitt, S.W., Holtmannspötter, H., Christiansen, S.H., Dicke, W., 2017. Development of an optimal filter substrate for the identification of small microplastic particles in food by micro-Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 409, 4099-4109. doi: 10.1007/s00216-017-0358-y
- Oßmann, B.E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S.H., Dicke, W., 2018. Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research*. 141, 307-316. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.027
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.-L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A., 2018. Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. *Frontiers in Marine Science*. 5. doi: 10.3389/fmars.2018.00252
- 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. *Environmental Pollution*. 216, 724-737. 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. *Environmental Pollution*. 212, 251-256. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.083
- Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpfen, T., Bergmann, M., Hehemann, L., Gerdt, G., 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nature Communications*. 9, 1505. doi: 10.1038/s41467-018-03825-5
- Pellini, G., Gomiero, A., Fortibuoni, T., Ferrà, C., Grati, F., Tassetti, A.N., Polidori, P., Fabi, G., Scarcella, G., 2018. Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*. 234, 943-952. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.038
- Peng, J.-H., Huang, C.-W., Weng, Y.-M., Yak, H.-K., 2007. Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish samples from rivers and estuaries in Taiwan. *Chemosphere*. 66, 1990-1997. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.094
- Petrie, A.G., Ellis, A.E., 2006. Evidence of particulate uptake by the gut of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 660-664. doi: 10.1016/j.fsi.2005.07.006
- Petrovic, M., Fernández-Alba, A.R., Borrull, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barceló, D., 2002. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 37-46. doi: 10.1002/etc.5620210106
- Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., Le Roux, F., 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in Microbiology*. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00686
- Phillips, M.B., Bonner, T.H., 2015. Occurrence and amount of microplastic ingested by fishes in watersheds of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 100, 264-269. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.041
- Phuong, N.N., Poirier, L., Pham, Q.T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018a. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? *Marine Pollution Bulletin*. 129, 664-674. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.054
- Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., Lagarde, F., 2018b. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10. doi: 10.1007/s11356-017-8862-3
- PlasticsEurope, 2015. *Plastics – the Facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Plastics Europe: Association of Plastic Manufacturers, Brussel.
- PlasticsEurope, 2016. *Plastics – the Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Disponible sur: <http://www.plasticseurope.fr/Document/plastics---the-facts-2016-15787.aspx?FolID=2>, Accédé le: 24/10/2016
- PlasticsEurope, 2018. *Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Disponible sur:

- https://www.plasticseurope.org/application/files/1715/2111/1527/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website.pdf, Accédé le: 29/01/2018
- Pohlert, T., Pohlert, M.T., 2018. Package 'PMCMR'.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*. 33, 929-936. doi: 10.1016/j.envint.2007.05.003
- Porte, C., Solé, M., Borgh, i.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. *Biomarkers*. 6, 335-350. doi: 10.1080/13547500110044771
- Possatto, F.E., Barletta, M., Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Dantas, D.V., 2011. Plastic debris ingestion by marine catfish: An unexpected fisheries impact. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1098-1102. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.01.036
- Potin, P., Floch, 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
- Préfecture de Haute Normandie, 2015. Arrête n°138-2015. Disponible sur: http://www.calvados.gouv.fr/IMG/pdf/138-2015_Ouverture_Coques_Gefosse-ABROG_46_et_86_2015-2.pdf, Accédé le: 27/05/2018
- Préfecture de Normandie, 2016. Arrête n°61/2016. Disponible sur: <http://www.pas-de-calais.gouv.fr/content/download/30112/200977/file/ar%C3%AAt%C3%A9%2061%202016%20modifi%C3%A9%20R%C3%A9glementation%20g%C3%A9n%C3%A9rale%20coques%2062%2080.pdf>, Accédé le: 27/05/2018
- Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Etxebarria, N., Fernández, L.A., 2007. Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1174, 40-49. doi: 10.1016/j.chroma.2007.07.054
- Primpke, S., Lorenz, C., Rascher-Friesenhausen, R., Gerdt, G., 2017. An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Analytical Methods*. 9, 1499-1511. doi: 10.1039/C6AY02476A
- Pujante, I.M., Díaz-López, M., Mancera, J.M., Moyano, F.J., 2017. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*. 48, 367-376. doi: 10.1111/are.13038
- Puls, J., Wilson, S.A., Höltzer, D., 2011. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*. 19, 152-165. doi: 10.1007/s10924-010-0258-0
- Qiu, Q., Peng, J., Yu, X., Chen, F., Wang, J., Dong, F., 2015. Occurrence of microplastics in the coastal marine environment: First observation on sediment of China. *Marine Pollution Bulletin*. 98, 274-280. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.028
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2014. Disponible sur: <http://www.R-project.org>, Accédé le: 15/10/2015
- Railo, S., Talvitie, J., Setälä, O., Koistinen, A., Lehtiniemi, M., 2018. Application of an enzyme digestion method reveals microlitter in *Mytilus trossulus* at a wastewater discharge area. *Marine Pollution Bulletin*. 130, 206-214. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.03.022

- Ramos, J.A., Barletta, M., Costa, M.F., 2012. Ingestion of nylon threads by Gerreidae while using a tropical estuary as foraging grounds. *Aquatic Biology*. 17, 29-34. doi: 10.3354/ab00461
- Ramu, K., Kajiwara, N., Isobe, T., Takahashi, S., Kim, E.-Y., Min, B.-Y., We, S.-U., Tanabe, S., 2007. Spatial distribution and accumulation of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in blue mussels (*Mytilus edulis*) from coastal waters of Korea. *Environmental Pollution*. 148, 562-569. doi: 10.1016/j.envpol.2006.11.034
- Rani, M., Shim, W.J., Jang, M., Han, G.M., Hong, S.H., 2017a. Releasing of hexabromocyclododecanes from expanded polystyrenes in seawater -field and laboratory experiments. *Chemosphere*. 185, 798-805. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.042
- Rani, M., Shim, W.J., Han, G.M., Jang, M., Song, Y.K., Hong, S.H., 2017b. Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. *Science of The Total Environment*. 579, 745-754. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.033
- 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. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 69, 352-366. doi: 10.1007/s00244-015-0224-x
- Reisser, J., Slat, B., Noble, K., du Plessis, K., Epp, M., Proietti, M., de Sonnevile, 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 Macrophytodebris. *Environ Sci Technol*. 49, 11158-11166. doi: 10.1021/acs.est.5b02005
- Renner, G., Schmidt, T.C., Schram, J., 2018. Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose? *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 1, 55-61. doi: 10.1016/j.coesh.2017.11.001
- Rezania, S., Park, J., Md Din, M.F., Mat Taib, S., Talaiekhozani, A., Kumar Yadav, K., Kamyab, H., 2018. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*. 133, 191-208. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.022
- Rios, L.M., Moore, C., Jones, P.R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 1230-1237. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.03.022
- Roch, S., Brinker, A., 2017. Rapid and Efficient Method for the Detection of Microplastic in the Gastrointestinal Tract of Fishes. *Environmental Science & Technology*. 51, 4522-4530. doi: 10.1021/acs.est.7b00364
- Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 65, 47-53. 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, Cham, pp. 117-140.
- Rochman, C.M., 2018. Microplastics research—from sink to source. *Science*. 360, 28.

- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*. 3, 3263. doi: 10.1038/srep03263
- Rochman, C.M., Lewison, R.L., Eriksen, M., Allen, H., Cook, A.-M., Teh, S.J., 2014. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish tissue may be an indicator of plastic contamination in marine habitats. *Science of The Total Environment*. 476–477, 622–633. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.058
- Rochman, C.M., Kross, S.M., Armstrong, J.B., Bogan, M.T., Darling, E.S., Green, S.J., Smyth, A.R., Veríssimo, D., 2015a. Scientific Evidence Supports a Ban on Microbeads. *Environmental Science & Technology*. 49, 10759–10761. doi: 10.1021/acs.est.5b03909
- Rochman, C.M., Tahir, A., Williams, S.L., Baxa, D.V., Lam, R., Miller, J.T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., Teh, S.J., 2015b. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*. 5. doi: 10.1038/srep14340
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., Fossi, M.C., 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 95, 358–361. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.048
- Rummel, C.D., Löder, M.G.J., Fricke, N.F., Lang, T., Griebeler, E.-M., Janke, M., Gerdt, G., 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 102, 134–141. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.043
- Ryan, P.G., Moloney, C.L., 1990. Plastic and other artefacts on South African beaches: temporal trends in abundance and composition. *South African Journal of Science*. 86, 450–452.
- Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 1999–2012. doi: 10.1098/rstb.2008.0207
- Sajiki, J., Yonekubo, J., 2003. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere*. 51, 55–62. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00789-0
- Salomon, J.-C., Breton, M., 1993. An atlas of long-term currents in the Channel. *Oceanologica Acta*. 16, 439–448.
- Salvador Cesa, F., Turra, A., Barúque-Ramos, J., 2017. Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: A review from textile perspective with a focus on domestic washings. *Science of The Total Environment*. 598, 1116–1129. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.172
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environment International*. 46, 50–62. doi: 10.1016/j.envint.2012.04.013
- Santana, M.F.M., Ascer, L.G., Custódio, M.R., Moreira, F.T., Turra, A., 2016. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*. 106, 183–189. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.074
- Schlenk, D., Sapozhnikova, Y., Irwin, M.A., Xie, L., Hwang, W., Reddy, S., Brownawell, B.J., Armstrong, J., Kelly, M., Montagne, D.E., Kolodziej, E.P., Sedlak, D., Snyder, S., 2005. In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern California Bight, USA, for estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24, 2820–2826. doi: 10.1897/05-116R.1
- Schmidt, C., Lautenschlaeger, C., Collnot, E.-M., Schumann, M., Bojarski, C., Schulzke, J.-D., Lehr, C.-M., Stallmach, A., 2013. Nano- and microscaled particles for drug

- targeting to inflamed intestinal mucosa—A first in vivo study in human patients. *Journal of Controlled Release*. 165, 139-145. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.10.019
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H.-U., Fürst, P., 2018. Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research*. 129, 154-162. doi: 10.1016/j.watres.2017.11.011
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*. 185, 77-83. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.013
- Setälä, O., Norkko, J., Lehtiniemi, M., 2016. Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Marine Pollution Bulletin*. 102, 95-101. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.053
- Sgier, L., Freimann, R., Zupanec, A., Kroll, A., 2016. Flow cytometry combined with viSNE for the analysis of microbial biofilms and detection of microplastics. *Nature Communications*. 7, 11587. doi: 10.1038/ncomms11587
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 26, 246-265. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- Shim, W.J., Thomposon, R.C., 2015. Microplastics in the Ocean. *Arch Environ Contam Toxicol*. 69, 265-268. doi: 10.1007/s00244-015-0216-x
- Shim, W.J., Hong, S.H., Eo, S.E., 2017. Identification methods in microplastic analysis: a review. *Anal Meth*. 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. *Marine Pollution Bulletin*. 113, 469-476. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.049
- Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2, 21-25. doi: 10.4103/2229-5186.79345
- Simon, M., van Alst, N., Vollertsen, J., 2018. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Research*. 142, 1-9. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.019
- Singh, B., Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 93, 561-584. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008
- 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? *Aquatic Toxicology*. 170, 259-261. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.12.002
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*. 34, 1033-1049. doi: 10.1016/j.envint.2008.01.004
- Socrates, G., 2004. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts, 3rd ed. John Wiley & Sons, 978-0-470-09307-8
- Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Kang, J.-H., Kwon, O.Y., Han, G.M., Shim, W.J., 2014. Large Accumulation of Micro-sized Synthetic Polymer Particles in the Sea Surface Microlayer. *Environmental Science & Technology*. 48, 9014-9021. doi: 10.1021/es501757s
- Stockholm Convention, 2016. Listing of POPs in the Stockholm Convention. Disponible sur: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>, Accédé le: 12/09/2016

- Strohmeier, T., Strand, Ø., Alunno-Bruscia, M., Duinker, A., Cranford, P.J., 2012. Variability in particle retention efficiency by the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 412, 96-102. doi: 10.1016/j.jembe.2011.11.006
- Suhrhoff, T.J., Scholz-Böttcher, B.M., 2016. Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics — A lab experiment. *Marine Pollution Bulletin*. 102, 84-94. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.054
- Sundt, P., Schulze, P.-E., Syversen, F., 2014. Sources of microplastic-pollution to the marine environment, Mepex for the Norwegian Environment Agency.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113, 2430-2435. doi: 10.1073/pnas.1519019113
- Suzuki, Y., Akamatsu, F., Nakashita, R., Korenaga, T., 2010. A Novel Method to Discriminate between Plant- and Petroleum-derived Plastics by Stable Carbon Isotope Analysis. *Chemistry Letters*. 39, 998-999. doi: 10.1246/cl.2010.998
- Tabb, D.L., Koenig, J.L., 1975. Fourier Transform Infrared Study of Plasticized and Unplasticized Poly(vinyl chloride). *Macromolecules*. 8, 929-934. doi: 10.1021/ma60048a043
- Takada, H., 2006. Call for pellets! International Pellet Watch Global Monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. *Marine Pollution Bulletin*. 52, 1547-1548. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.10.010
- Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 2079-2096. doi: 10.1098/rstb.2008.0281
- Tan, G.H., 1995. Residue levels of phthalate esters in water and sediment samples from the Klang River basin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 54, 171-176. doi: 10.1007/bf00197427
- Tanaka, K., Takada, H., 2016. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*. 6, 34351. doi: 10.1038/srep34351
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.-a., Watanuki, Y., 2013. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Marine Pollution Bulletin*. 69, 219-222. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.12.010
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.-a., Watanuki, Y., 2015. Facilitated Leaching of Additive-Derived PBDEs from Plastic by Seabirds' Stomach Oil and Accumulation in Tissues. *Environmental Science & Technology*. 49, 11799-11807. doi: 10.1021/acs.est.5b01376
- Tanaka, Y., Takahashi, K., Sasao, T., Kirigaya, T., Hosoi, S., Nagaoka, N., Kawamura, T., Nakazawa, H., 2003. Detection of tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite (Irgafos 168, antioxidant in plastics) and its oxide in commercial frozen vegetables. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 44, 181-185.
- Tangkanakul, P., Auttaviboonkul, P., Tungtrakul, P., Ruamrux, M., Hiraga, C., Thaveesook, K., Yunchalad, M., 2005. Utilization of fish flour in canned concentrated seasoning stock for Thai foods preparation. *Kasetsart Journal*. 39, 308-318.
- Taylor, M.L., Gwinnett, C., Robinson, L.F., Woodall, L.C., 2016. Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms. *Scientific Reports*. 6, 33997. doi: 10.1038/srep33997

- Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environmental Science & Technology*. 51, 13689-13697. doi: 10.1021/acs.est.7b03667
- 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. *Environmental Science & Technology*. 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. *Environmental Science & Technology*. 41, 7759-7764. doi: 10.1021/es071737s
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 364, 2027-2045. doi: 10.1098/rstb.2008.0284
- Thompson, R.C., 2006. Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. *Marine Nature Conservation in Europe 2006*, 107-115.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364, 1973-1976. doi: 10.1098/rstb.2009.0054
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*. 304, 838-838. doi: 10.1126/science.1094559
- 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
- Tsuge, S., Ohtani, H., Watanabe, C., 2011. *Pyrolysis-GC/MS Data Book of Synthetic Polymers*. Elsevier, pp. 390, 978-0-444-53892-5
- Turner, A., Lau, K.S., 2016. Elemental concentrations and bioaccessibilities in beached plastic foam litter, with particular reference to lead in polyurethane. *Marine Pollution Bulletin*. 112, 265-270. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.005
- US Environmental Protection Agency, 2006. Certain Polybrominated Diphenylethers; Significant New Use Rule. Disponible sur: <https://www.federalregister.gov/documents/2006/06/13/E6-9207/certain-polybrominated-diphenylethers-significant-new-use-rule>, Accédé le: 26/04/2017
- US Environmental Protection Agency, 2010a. Hexabromocyclododecane (HBCD) Action Plan. Disponible sur: <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/hexabromocyclododecane-hbcd-action-plan>, Accédé le: 26/04/2017
- US Environmental Protection Agency, 2010b. Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) Action Plan. Disponible sur: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rin2070-za09_np-npes_action_plan_final_2010-08-09.pdf, Accédé le: 04/05/2016
- US Environmental Protection Agency, 2012. Certain Polybrominated Diphenylethers; Significant New Use Rule and Test Rule. Disponible sur: http://blogs.edf.org/health/files/2012/07/EDF_Earthjustice-Comments-on-Proposed-PBDE-test-rule-and-SNUR-FINAL-7-31-12.pdf, Accédé le: 26/04/2017

- 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., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*. 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. *Environmental Pollution*. 182, 495-499. doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.013
- 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. *Environmental Pollution*. 199, 10-17. doi: 10.1016/j.envpol.2015.01.008
- van Den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal Chromatography A*. 11, 463-471. doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X
- van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B.D., van Franeker, J.A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., Law, K.L., 2015. A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*. 10, 124006.
- van Wezel, A., Caris, I., Kools, S.A.E., 2016. Release of primary microplastics from consumer products to wastewater in the Netherlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1-5. doi: 10.1002/etc.3316
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., Kotterman, M.J., Diogène, J., Bekaert, K., Robbens, J., 2015a. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*. 143, 46-55. doi: 10.1016/j.envres.2015.07.016
- Vandermeersch, G., Lourenço, H.M., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., Sloth, J.J., Kwadijk, C., Barcelo, D., Allegaert, W., Bekaert, K., Fernandes, J.O., Marques, A., Robbens, J., 2015b. Environmental contaminants of emerging concern in seafood – European database on contaminant levels. *Environmental Research*. 143, Part B, 29-45. doi: 10.1016/j.envres.2015.06.011
- Vendel, A.L., Bessa, F., Alves, V.E.N., Amorim, A.L.A., Patrício, J., Palma, A.R.T., 2017. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. *Marine Pollution Bulletin*. 117, 448-455. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.01.081
- Verslycke, T.A., Vethaak, A.D., Arijs, K., Janssen, C.R., 2005. Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Environmental Pollution*. 136, 19-31. doi: 10.1016/j.envpol.2004.12.008
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*. 59, 511-524. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.12.053
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology*. 46, 11327-11335. doi: 10.1021/es302332w
- Wagener, A., Hamacher, C., Farias, C., Godoy, J.M., Scofield, A., 2010. Evaluation of tools to identify hydrocarbon sources in recent and historical sediments of a tropical bay. *Marine Chemistry*. 121, 67-79. doi: 10.1016/j.marchem.2010.03.005

- Wagner, J., Wang, Z.-M., Ghosal, S., Rochman, C., Gassel, M., Wall, S., 2017. Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut matrices. *Analytical Methods*. doi: 10.1039/C6AY02396G
- Wagner, S., Hüffer, T., Klöckner, P., Wehrhahn, M., Hofmann, T., Reemtsma, T., 2018. Tire wear particles in the aquatic environment - A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects. *Water Research*. 139, 83-100. doi: 10.1016/j.watres.2018.03.051
- Wald, M., Rehbein, H., Beermann, C., Bußmann, B., Schwarz, K., 2016. Purification and characterization of pepsinogen and pepsin from the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *European Food Research and Technology*. 242, 1925-1935. doi: 10.1007/s00217-016-2692-2
- Waller, C.L., Griffiths, H.J., Waluda, C.M., Thorpe, S.E., Loaiza, I., Moreno, B., Pacherras, C.O., Hughes, K.A., 2017. Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. *Science of The Total Environment*. 598, 220-227. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.283
- Wang, L., Zhang, J., Hou, S., Sun, H., 2017a. A Simple Method for Quantifying Polycarbonate and Polyethylene Terephthalate Microplastics in Environmental Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology Letters*. 4, 530-534. doi: 10.1021/acs.estlett.7b00454
- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2015. A Comparison Effect of Copper Nanoparticles versus Copper Sulphate on Juvenile *Epinephelus coioides*: Growth Parameters, Digestive Enzymes, Body Composition, and Histology as Biomarkers. *International Journal of Genomics*. 2015, 10. doi: 10.1155/2015/783021
- Wang, Z.-M., Wagner, J., Ghosal, S., Bedi, G., Wall, S., 2017b. SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. *Science of The Total Environment*. 603-604, 616-626. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.047
- Wang, Z., Yang, C., Brown, C., Hollebhone, B., Landriault, M., 2008. A case study: distinguishing pyrogenic hydrocarbons from petrogenic hydrocarbons. *International Oil Spill Conference Proceedings*. 2008, 311-320. doi: 10.7901/2169-3358-2008-1-311
- Wardrop, P., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P.D., Miranda, A., Tang, M., Clarke, B.O., 2016. Chemical Pollutants Sorbed to Ingested Microbeads from Personal Care Products Accumulate in Fish. *Environmental Science & Technology*. 50, 4037-4044. doi: 10.1021/acs.est.5b06280
- Watson, R., Revenga, C., Kura, Y., 2006. Fishing gear associated with global marine catches: I. Database development. *Fisheries Research*. 79, 97-102. doi: 10.1016/j.fishres.2006.01.010
- 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. *Environmental Science & Technology*. 49, 14597-14604. doi: 10.1021/acs.est.5b04026
- 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*. *Environmental Science & Technology*. 48, 8823-8830. doi: 10.1021/es501090e
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E.M., Kamermans, P., Koelmans, A.A., 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31, 2490-2497. doi: 10.1002/etc.1984
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., Zemla, J., 2017. Package ‘corrplot’. *Statistician*. 56, 316-324.

- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35, 1632-1640. doi: 10.1002/etc.3432
- Welden, N.A., Abylkhani, B., Howarth, L.M., 2018. The effects of trophic transfer and environmental factors on microplastic uptake by plaice, *Pleuronectes plastessa*, and spider crab, *Maja squinado*. *Environmental Pollution*. 239, 351-358. doi: 10.1016/j.envpol.2018.03.110
- Welden, N.A.C., Cowie, P.R., 2016a. Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environmental Pollution*. 218, 895-900. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.020
- Welden, N.A.C., Cowie, P.R., 2016b. Environment and gut morphology influence microplastic retention in langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environmental Pollution*. 214, 859-865. doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.067
- Wesch, C., Bredimus, K., Paulus, M., Klein, R., 2016. Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution*. 218, 1200-1208. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.076
- Wesch, C., Elert, A.M., Wörner, M., Braun, U., Klein, R., Paulus, M., 2017. Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data. *Scientific Reports*. 7, 5424. doi: 10.1038/s41598-017-05838-4
- Wickham, H., 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer, 3319242776
- Wójcik-Fudalewska, D., Normant-Saremba, M., Anastácio, P., 2016. Occurrence of plastic debris in the stomach of the invasive crab *Eriocheir sinensis*. *Marine Pollution Bulletin*. 113, 306-311. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.059
- Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L., 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. *Royal Society Open Science*. 1, 140317. doi: 10.1098/rsos.140317
- World Economic Forum, 2016. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics.
- Worthington, T.M., 1993. Worthington Enzyme Manual. Disponible sur: <http://www.worthington-biochem.com/PM/assay.html>, Accédé le: 02/27/2017
- Wright, S.L., Kelly, F.J., 2017. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science & Technology*. 51, 6634-6647. doi: 10.1021/acs.est.7b00423
- Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013a. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution*. 178, 483-492. doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013b. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*. 23, R1031-R1033. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.068
- Wurl, O., Lam, P.K.S., Obbard, J.P., 2006. Occurrence and distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the dissolved and suspended phases of the sea-surface microlayer and seawater in Hong Kong, China. *Chemosphere*. 65, 1660-1666. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.02.024
- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Caba, A., Ruck, W., 2005. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmospheric Environment*. 39, 3209-3219. doi: 10.1016/j.atmosenv.2005.02.021
- Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W., 2006. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. *Environmental Pollution*. 142, 170-180. doi: 10.1016/j.envpol.2005.08.073

- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Lohmann, R., Caba, A., Ruck, W., 2007. Occurrence and Air–Sea Exchange of Phthalates in the Arctic. *Environmental Science & Technology*. 41, 4555-4560. doi: 10.1021/es0630240
- Yaghoubi, M., Mozanzadeh, M.T., Marammazi, J.G., Safari, O., Gisbert, E., 2016. Dietary replacement of fish meal by soy products (soybean meal and isolated soy protein) in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). *Aquaculture*. 464, 50-59. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.002
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., Kolandhasamy, P., 2015. Microplastic Pollution in Table Salts from China. *Environmental Science & Technology*. 49, 13622-13627. doi: 10.1021/acs.est.5b03163
- Yang, Y., Hu, C., Zhong, H., Chen, X., Chen, R., Yam, K.L., 2016. Effects of Ultraviolet (UV) on Degradation of Irgafos 168 and Migration of Its Degradation Products from Polypropylene Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 7866-7873. doi: 10.1021/acs.jafc.6b03018
- 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.
- Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*. 47, 7137-7146. doi: 10.1021/es401288x
- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 86, 562-568. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.06.032
- Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P.A., Leusch, F.D.L., 2017a. Impact of Microplastic Beads and Fibers on Waterflea (*Ceriodaphnia dubia*) Survival, Growth, and Reproduction: Implications of Single and Mixture Exposures. *Environmental Science & Technology*. 51, 13397-13406. doi: 10.1021/acs.est.7b03574
- Ziajahromi, S., Neale, P.A., Rintoul, L., Leusch, F.D.L., 2017b. Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. *Water Research*. 112, 93-99. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.042
- Zitko, V., Hanlon, M., 1991. Another source of pollution by plastics: skin cleaners with plastic scrubbers. *Marine Pollution Bulletin*. 22, 41-42.

Annexes

Annexe 1 : Article 1 : Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review

Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review

Ludovic HERMABESSIERE^a, Alexandre DEHAUT^a, Ika PAUL-PONT^b, Camille LACROIX^c, Ronan JEZEQUEL^c, Philippe SOUDANT^b & Guillaume DUFLOS^{a*}

^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 CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29218 Brest Cedex 2, France

* Corresponding author: guillaume.duflos@anses.fr

Abstract

Plastics debris, especially microplastics, have been found worldwide in all marine compartments. Much research has been carried out on adsorbed pollutants on plastic pieces and hydrophobic organic compounds (HOC) associated with microplastics. However, only a few studies have focused on plastic additives. These chemicals are incorporated into plastics from which they can leach out as most of them are not chemically bound. As a consequence of plastic accumulation and fragmentation in oceans, plastic additives could represent an increasing ecotoxicological risk for marine organisms. The present work reviewed the main class of plastic additives identified in the literature, their occurrence in the marine environment, as well as their effects on and transfers to marine organisms. This work identified polybrominated diphenyl ethers (PBDE), phthalates, nonylphenols (NP), bisphenol A (BPA) and antioxidants as the most common plastic additives found in marine environments. Moreover, transfer of these plastic additives to marine organisms has been demonstrated both in laboratory and field studies. Upcoming research focusing on the toxicity of microplastics should include these plastic additives as potential hazards for marine organisms, and a greater focus on the transport and fate of plastic additives is now required considering that these chemicals may easily leach out from plastics.

Keywords

Microplastics, Plastic additives, Bisphenol A, Phthalates, Brominated Flame retardant

1. Introduction

Due to their numerous societal benefits, plastics hold an important place in human society (Andrady et Neal, 2009). Plastic, a man-made material, is inexpensive, strong, durable, lightweight and easy to produce (Barnes et al., 2009). As a consequence, plastic production has been increasing since the 1950s, and notably rose from 225 million tons in 2004 to 322 million tons in 2015, representing a 43% increase over the last decade (PlasticsEurope, 2016). However, this estimate does not take into account the proportion of synthetic fibers which are widely used in the textile and fishery industries (Dris et al., 2016) and there is an underestimation of 15% to 20% depending on the year (Industrievereinigung Chemiefaser, 2013). Low estimates predicted that floating marine plastic weigh between 70,000 and 270,000 tons (Cózar et al., 2014; Eriksen et al., 2014; van Sebille et al., 2015). Small pieces of plastics called microplastics (MP) account for a total of 51 trillion plastic debris (van Sebille et al., 2015).

Microplastics have been defined as plastics particles smaller than 5 mm (Arthur et al., 2009). Growing attention has been accorded to microplastics during the last decade, since the publication by Thompson et al. (2004). Micro-sized plastic pieces originate from two distinct pathways: primary and secondary sources. Primary sources of MP correspond to (i) plastics that are directly manufactured at micrometric size, including plastic pellets (Barnes et al., 2009; Cole et al., 2011), (ii) MP from exfoliating cosmetics (Chang, 2015; Fendall et Sewell, 2009; Napper et al., 2015; Zitko et Hanlon, 1991) and (iii) clothing fibers found in wastewater treatment plants (Browne et al., 2011; Carr et al., 2016). Secondary MP results from the breakdown of larger pieces due to mechanical abrasion and photochemical oxidation in the environment (Andrady, 2011; Bouwmeester et al., 2015; Lambert et Wagner, 2016b). MP can also degrade into smaller pieces called nanoplastics (Gigault et al., 2016; Koelmans et al., 2015; Lambert et Wagner, 2016b).

Due to their small size, MP can be ingested by a wide range of marine organisms such as zooplankton, bivalves and worms (De Witte et al., 2014; Devriese et al., 2015; Graham et Thompson, 2009; Rochman et al., 2015b; Sussarellu et al., 2016; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015) and by organisms from higher trophic levels such as fish (Boerger et al., 2010; Carpenter et al., 1972; Dantas et al., 2012; Foekema et al., 2013; Lusher et al., 2013; Neves et al., 2015; Possatto et al., 2011; Rochman et al., 2015b) and marine mammals (Eriksson et Burton, 2003; Lusher et al., 2015c). This ingestion of MPs can result in physical damage such as obstruction or internal abrasions (Wright et al., 2013a). In addition to these physical threats, MP can potentially transfer chemicals adsorbed on their surface (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2007; Teuten et al., 2009) or plastic additives. However, less attention has been paid to the transfer of plastic additives to marine organisms in comparison with hydrophobic organic compounds (HOC), despite the fact that many additives have been recognized as hazardous (Lithner et al., 2011). Therefore, the transport and fate of plastic additives leaching out from plastic debris should definitely be carefully addressed in future field, laboratory and modelling works.

Plastics are made by polymerizing monomers and other substances (Lithner et al., 2011) including plastic additives. Plastic additives are chemical compounds, like plasticizers, which provide required properties to a plastic polymer or are incorporated to facilitate the manufacturing process (OECD, 2004). Moreover, some plastic additives are used as monomers, for example bisphenol A is the monomer of polycarbonate (PC) but also a stabilizer in other polymers. Plastic additives are mainly used as plasticizers, flame retardants, stabilizers, antioxidants and pigments. Phthalates, BPA, nonylphenols, and brominated flame retardants (BFR) are the most common additives recovered from the environment (Bergé et al., 2012; David et al., 2009; de Boer et al., 1998; de los Ríos et al.,

2012; Mackintosh *et al.*, 2004; Net *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2007) and represent a hazard to the environment and organisms (Lithner *et al.*, 2011; Meeker *et al.*, 2009; Oehlmann *et al.*, 2009). These plastic additives are released into the marine environment by numerous pathways including industrial and municipal wastewater, atmospheric deposition, runoff and river transport resulting from application of sewage sludge in agriculture. In addition leaching of plastic additives from macro and microplastics is known to occur in the marine environment. Thus, the accumulation and degradation of plastic debris might represent another major input of these chemical compounds in oceans. As a consequence, more research is needed on the hazards of plastic additives associated with microplastics.

The aim of this review is to (i) list and describe the most predominant plastic additives used worldwide in the plastic industry, (ii) present an overview of the occurrence of plastics additives in the marine environment, and (iii) document the effects of plastic additives on marine organisms. Lastly, recommendations will be made in order to identify the polymer-additives pairs of major concern on which further research should focus.

2. Chemicals used as plastic additives

Multiple types and families of chemicals are mixed with polymers to produce plastics. The type of additive depends on the plastic polymer and the requirements of the final product (Table 1).

Table 1: List of the most commonly produced polymers and their associated plastic additives. Adapted from Hansen *et al.* (2013)

Polymer	Consumption in the EU27 (in million tons) in 2015 ¹	Additive types	Amount in polymers (% w/w)	Hazardous substances ²
PP	9	Antioxidant	0.05 – 3	Bisphenol A; Octylphenol; Nonylphenol
		Flame retardant (cable insulation and electronic applications)	12 – 18	Brominated flame retardant; Boric acid; Tris(2-chloroethyl)phosphate
HDPE	8	Antioxidant	0.05 - 3	Bisphenol A; Octylphenol; Nonylphenol
		Flame retardant (cable insulation application)	12 -18	Brominated flame retardant; Boric acid; Tris(2-chloroethyl)phosphate
LDPE	6	Antioxidant	0.05 – 3	Bisphenol A; Octylphenol; Nonylphenol
		Flame retardant (cable insulation application)	12 – 18	Brominated flame retardant; Boric acid; Tris(2-chloroethyl)phosphate
PVC	5	Plasticizer	10 – 70	Phthalate
		Stabilizer	0.5 – 3	Bisphenol A; Nonylphenol
PUR	3.5	Flame retardant	12 - 18	Brominated flame retardant; Boric acid; Tris(2-chloroethyl)phosphate

¹ According to [PlasticsEurope \(2016\)](#) ; PP: Polypropylene; HDPE: High Density Polyethylene; LDPE: Low Density Polyethylene; PVC: Polyvinyl Chloride; PUR: Polyurethane.

² Hazardous substances refer to chemicals that pose a risk to the environment and to human health as defined by the REACH regulation in the European Union according to the [European Chemical Agency \(2017\)](#).

The following section describes the most common additive types used in the manufacturing processes (Table 2) that have been reported in macro- and microplastic debris collected in environmental surveys: brominated flame retardants, phthalates used as plasticizers, nonylphenols, bisphenol A and antioxidants.

Table 2: List of common plastic additives and their associated functions and potential effects

Additives	Function	Effects
Brominated Flame Retardants (BFR)	Reduce flammability in plastic. Also adsorbed on plastic from the surrounding environment.	Potential endocrine disruptors
Phthalates	Plasticizers to soften plastic mainly in polyvinyl chloride.	Endocrine disruptors
Nonylphenol	Antioxidant and plasticizer in some plastics	Endocrine disruptors
Bisphenol A (BPA)	Monomer in polycarbonate and epoxy resins. Antioxidant in some plastics.	Endocrine disruptors Estrogen mimic
Irganox®	Antioxidant in some plastics.	

The main plastic additives described are listed in Table 3 with their associated octanol-water partition coefficient (K_{ow}). K_{ow} has been used for predicting how a chemical will concentrate in

marine organisms and an increase in log K_{ow} indicates an increase in the potential bioconcentration in organisms (Net et al., 2015).

Table 3: Plastic additives and their associated octanol-water partition coefficients (Log K_{ow}). Data were extracted from the following reviews: Bergé et al. (2012), Espinosa et al. (2016), Net et al. (2015) and Oehlmann et al. (2008)

Full name	Abbreviation	Log K_{ow}
butyl benzyl phthalate	BBP	4.70
di(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	7.73
diethyl phthalate	DEP	2.54
diisobutyl phthalate	DiBP	4.27
diisodecyl phthalate	DiDP	9.46
diisononyl phthalate	DiNP	8.60
dimethyl phthalate	DMP	1.61
di- <i>n</i> -butyl phthalate	DnBP	4.27
di- <i>n</i> -octyl phthalate	DnOP	7.73
hexabromocyclododecane	HBCD	5.07 – 5.47
polybrominated diphenyl ether	PBDE	5.52 – 11.22
tetrabromobisphenol A	TBBPA	4.5
bisphenol A	BPA	3.40
nonylphenol	NP	4.48 – 4.80

2.1. Brominated flame retardants

Brominated flame retardants (BFR) are a class of additives used in plastic products to reduce flammability. These BFR are used in a variety of consumer products ranging from electronic devices to insulation foams. BFRs include a wide range of chemicals, of which polybrominated diphenyl ethers (PBDE),

hexabromocyclododecane (HBCD – Pubchem ID: 18529) and tetrabromobisphenol A (TBBPA – Pubchem ID: 6618) (Talsness et al., 2009) represent the main BFRs used in the plastic industry. These 3 classes (PBDE, HBCD and TBBPA) are described in details below. Lately, attention has been given to other emerging BFRs such as 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane

(BTBPE – Pubchem ID: 37840), decabromodiphenylethane (DBDPE – Pubchem ID: 10985889) and hexabromobenzene (HBB – Pubchem ID: 6905) as these have been identified in many environmental compartments, organisms, food and humans (European Food Safety Authority, 2012). As they are not chemically bound to the polymer matrix, they can leach into the surrounding environment (Engler, 2012; Meeker *et al.*, 2009) with an exception for TBBPA which is chemically bound to the polymer (Morris *et al.*, 2004).

PBDEs are hydrophobic substances that include numerous formulations used in plastics as flame retardants. Indeed, there are three main commercial formulations called penta-, octa- and deca-BDEs (Chua *et al.*, 2014). These additives are ubiquitous, toxic, persistent and bioaccumulate in the environment and are of great concern for human health (Engler, 2012). As a result, penta- and octa-BDEs have been banned by the European Union since 2004 (European Directive, 2003), while deca-BDE was banned only in 2009 from electronic and electrical applications in the European Union (European Council Decision, 2009). These formulations can no longer be used in mixtures or products with a concentration higher than 0.1% by mass. In addition, tetra- to hepta-BDEs are listed for elimination in the Annex A of the Stockholm Convention on persistent organic pollutant (POP) (Stockholm Convention, 2016). Moreover, in Canada the use of tetra- to deca-BDE has been restricted under the SOR/2008-218 Regulations (Consolidated Regulation, 2008). Since 2006, penta- to octa- BDE have been subjected to a 90 day notification before importation or production in the US. Finally, deca-BDE importation and production have been entirely stopped (US Environmental Protection Agency, 2006, 2012) since 2013.

HBCD has three dominant stereoisomers: α -, β -, and γ -HBCD (European Food Safety Authority, 2011a). These BFRs are listed as POPs in the Stockholm Convention (Stockholm Convention, 2016) and the three isomers are subject to a request for authorization in the European Union (European Council Regulation, 2006). HBCDs

are found in expanded PS (EPS) and extruded PS (XPS) up to 4-7% by weight (Al-Odaini *et al.*, 2015). Its use has been subjected to authorization in the European Union since 2006 in the annex XIV of the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) regulation (European Food Safety Authority, 2011a). Moreover, in 2013 HBCD was listed for elimination in the Annex A of the Stockholm Convention with specific exemption for use and production in EPS and XPS (Cruz *et al.*, 2015; Stockholm Convention, 2016). In the US, Environmental Protection Agency conducted a risk assessment for HBCD according to the 2010 “Toxic Substances Control Act” action plan (US Environmental Protection Agency, 2010a).

TBBPA is produced by brominating bisphenol A (European Food Safety Authority, 2011b). According to the European Food Safety Authority (2011b), TBBPA is the most commonly produced BFR in the world and represents 60% of the BFR market. This BFR is used in acrylonitrile butadiene styrene (ABS) and in other plastic such as high impact PS and phenolic resin (Cruz *et al.*, 2015). Until now, no legislation concerning TBBPA has been applied in the European Union (Vandermeersch *et al.*, 2015b).

2.2. Phthalates

Phthalic acid esters (PAE) or phthalates are a family of plastic additives used as plasticizers, mainly in PVC production (Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt e.V., 2006). As a result, PVC can contain 10% to 60% phthalates by weight (Net *et al.*, 2015). As phthalates are not chemically bound to the polymer matrix, they can easily leach into the environment during manufacturing, use and disposal (Net *et al.*, 2015). PAEs have been found in a wide range of environments (as reviewed by Net *et al.* (2015)) and this is of concern, since some phthalates have been defined as endocrine disruptors, even at low concentrations (Oehlmann *et al.*, 2009).

In 2015, 8.4 million tons of plasticizers were used around the world, and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP – Pubchem ID: 8343) was the most commonly used plasticizer, representing

37.1% of the global plasticizer market (ECPI, 2016). Europe accounted for 1.3 million tons of the global plasticizer market in 2015 (ECPI, 2016), but DEHP was not the most commonly used plasticizer in Europe, as suggested by its 20% decrease in consumption between 1999 and 2004. DEHP has gradually been replaced by diisononyl phthalate (DiNP – Pubchem ID: 590836), diisodecyl phthalate (DiDP – Pubchem ID: 33599) and di(2-Propyl Heptyl) phthalate (DPHP – Pubchem ID: 92344), which represented 57% of plasticizer consumption in Europe in 2015 (Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt e.V, 2006; ECPI, 2016).

Bisphenol A

BPA (Pubchem ID: 6623) is the most representative chemical of the bisphenol group and is one of the most commonly produced chemicals worldwide, with over three million tons produced annually (Laing *et al.*, 2016). BPA is mainly used as a monomer for polycarbonate (PC) plastics (65% of volume used) and epoxy resins (30% of volume used), which are for instance the main component of the lining layer of aluminum cans (Crain *et al.*, 2007; ICIS, 2003). BPA can also be used as an antioxidant or as a plasticizer in other polymers (PP, PE and PVC) (Rani *et al.*, 2015). Leaching of BPA can occur (Sajiki *et Yonekubo*, 2003), leading to the release of this additive from food and drink packaging, which is considered as a source of exposure for human beings (Vandermeersch *et al.*, 2015b). Despite its potential to leach from food packaging and the fact that it has been identified as a significant endocrine disruptor (Oehlmann *et al.*, 2009), BPA is still allowed in the European Union for use in food contact material (European Council Regulation, 2011). Other bisphenol analogs, such as bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S are used in plastics and may represent a threat to the environment even though their toxicity is still unknown (Chen *et al.*, 2016).

2.3. Nonylphenols

Nonylphenols (NP) are intermediate products of the degradation of a widely used class of surfactants and antioxidants: nonylphenol

ethoxylates (NPE) (Engler, 2012). NP and NPE are organic chemicals used for many applications such as paints, pesticides, detergents and personal care products (US Environmental Protection Agency, 2010b). They can also be used as antioxidants and plasticizers for the production of plastics (Rani *et al.*, 2015; US Environmental Protection Agency, 2010b). Furthermore, NP have been found to leach out from plastic bottles to their water content (Loyo-Rosales *et al.*, 2004). Moreover, effluents from wastewater treatment plants are the major source of NP and NPE in the environment (Soares *et al.*, 2008). NP are considered as endocrine disruptors and their use is prohibited in the European Union due to their effects on the environment and human health (Rani *et al.*, 2015).

2.4. Antioxidants

Antioxidants are used as additives in many synthetic polymers including polyolefins (mainly PE and PP) which represent 60% of global demand for antioxidant additives (Höfer, 2012). Antioxidants are used to prevent the ageing of plastics and to delay oxidation (Lau *et Wong*, 2000). However, as with other plastic additives, antioxidants can leach out of the plastic and can migrate to food from plastic packaging and pose a threat in terms of food safety (Lau *et Wong*, 2000). Antioxidants from the Irganox® series are commonly used in plastics and they include Octadecyl 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate (Irganox® 1076 – Pubchem: 16386), Pentaerythrityl-tetrakis-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate (Irganox® 1010 – Pubchem ID: 64819) and 2,4-di-*tert*-butylphenol (Irgafos® 168 – Pubchem ID: 91601) (Lau *et Wong*, 2000).

Owing to the variety of plastic additives (BFR, phthalates, BPA, NP and antioxidants) used for plastic products conception and their detection in macro- and microplastic debris collected in environmental surveys, their occurrence in environmental matrices (water, sediment, biota) is expected and may pose major environmental concern as described below.

3. Plastic additives in the environment

3.1. Marine waters

Marine waters are affected by anthropogenic pressures as this natural compartment is the final receptacle of all discharge waters. Consequently, chemical pollutants including plastics additives have been detected in worldwide marine waters (Tables 4, 5 and 6) (Bergé *et al.*, 2013; Net *et al.*,

2015). Of all BFR, PBDE are the most commonly studied molecules in marine environments. PBDE have been widely found and multiple congeners have been monitored (Table 4). Concentrations varied from a few ng L⁻¹ to more than 10 ng L⁻¹ and congeners varied among the studied sites (Table 4).

Table 4: Concentrations of polybrominated diphenyl ether (PBDE) in seawater in ng L-1

Location	ΣPBDE (ng L ⁻¹)	Range (ng L ⁻¹)	BDE congeners detected	Dominant congener	References
Port sea, Mediterranean Sea, Spain	23.2	4.2 – 19	BDE-28, -47	BDE-28	Sánchez-Avila <i>et al.</i> (2012)
Surface microlayer, China Sea, Hong-Kong	0.33	0.004 – 0.056	BDE-28, -47, -99, -100, -156, -183	BDE-156	Wurl <i>et al.</i> (2006)
Subsurface water, China Sea, Hong-Kong	0.1	0.002 – 0.082	BDE-28, -47, -99, -100, -183	BDE-47	Wurl <i>et al.</i> (2006)

Many studies on the contamination of the marine environment by phthalates showed concentrations ranging from a few pg L⁻¹ to

around 10 µg L⁻¹, with DEHP being the most concentrated phthalate found in marine waters (Table 5).

Table 5: Concentrations of phthalates in seawater in µg L-1

Location	DMP	DEP	DnBP	DiBP	BBP	DEHP	DnOP	Reference
Tees Bay, UK	< 1 x 10 ⁻³	0.025 – 0.5	0.47 – 0.55	0.66 – 1.1	–	0.98 – 2.2	–	Law <i>et al.</i> (1991)
North Sea, Germany	0.2 x 10 ⁻³	0.67 x 10 ⁻²	1.7 x 10 ⁻³	–	0.05 x 10 ⁻³	2.2 x 10 ⁻³	x	Xie <i>et al.</i> (2005)
Surface waters, the Netherlands	0.004 – 0.49	0.07 – 2.3	<0.066 – 3.1	–	0.001 – 1.8	0.9 – 5	0.002 – 0.078	Vethaak <i>et al.</i> (2005)
Bay of Biscay, Spain	(7.5 ± 0.4) x 10 ⁻³	(33 ± 3) x 10 ⁻³	(83 ± 7) x 10 ⁻³	–	(8 ± 1) x 10 ⁻³	(64 ± 4) x 10 ⁻³	(3.6 ± 0.4) x 10 ⁻³	Prieto <i>et al.</i> (2007)
Coastal seawater, Mediterranean Sea, Spain	0.003 – 0.14	0.024 – 0.48	–	–	0.001 – 0.10	0.03 – 0.62	–	Sánchez-Avila <i>et al.</i> (2012)
Port sea, Mediterranean Sea, Spain	0.004 – 0.012	0.024 – 0.87	–	–	0.003 – 0.80	0.06 – 5.97	–	Sánchez-Avila <i>et al.</i> (2012)
River – sea interface, Mediterranean Sea, Spain	0.005	0.07 – 0.16	–	–	0.003 – 0.07	0.02 – 0.21	–	Sánchez-Avila <i>et al.</i> (2012)
Ligurian Sea, Mediterranean Sea, Italy ¹	–	–	–	–	–	18.38 ± 44.39	–	Fossi <i>et al.</i> (2012)
Sardinian Sea, Mediterranean	–	–	–	–	–	23.42 ± 32.46	–	Fossi <i>et al.</i> (2012)

n Sea, Italy									
Barkley Sound, Canada			0.18	–			0.01	–	Keil <i>et al.</i> (2011)
Puget Sound, USA			3.0				0.95		
Klang River estuary, Australia							0.06	–	Keil <i>et al.</i> (2011)
Caspian Sea, Iran	0.49	0.52					0.64		Tan (1995)
Arctic	40×10^{-6}	138×10^{-6}	51×10^{-6}	22×10^{-6}	8×10^{-6}	448×10^{-6}			Hadjmohammadi <i>et al.</i> (2011)
									Xie <i>et al.</i> (2007)

Nonylphenol was detected in marine waters of Europe, Asia and North America (Bergé *et al.*, 2012; David *et al.*, 2009) (Table 6) and concentrations ranged from $0.2 \times 10^{-5} \mu\text{g L}^{-1}$ in the Sea of Japan to $4.6 \mu\text{g L}^{-1}$ in the

Mediterranean Sea (Table 6). BPA, as for other additives, has been globally quantified in marine waters all around the world and concentrations ranged from ng L⁻¹ in China to $\mu\text{g L}^{-1}$ in coastal waters of Singapore (Table 6).

Table 6: Ranges of concentrations of nonylphenol and BPA in seawater in $\mu\text{g L}^{-1}$

Chemicals	Location	Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$)	References
Nonylphenol	German Bight, North Sea, Germany	0.006 – 0.033	Bester <i>et al.</i> (2001)
	Estuaries, the Netherlands	9×10^{-5} – 0.0014	Xie <i>et al.</i> (2006)
	Estuaries, UK	0.031 – 0.934	Jonkers <i>et al.</i> (2003)
	Mediterranean Sea, Spain	0.1 – 2.6	Blackburn <i>et al.</i> (1999)
	Venetian Lagoon, Italy	0.3 – 4.1	Petrovic <i>et al.</i> (2002)
	Jamaica Bay, US	0.004 – 0.211	Pojana <i>et al.</i> (2007)
	Masan Bay, South Korea	0.077 – 0.416	Ferguson <i>et al.</i> (2001)
	Sea of Japan, Japan	0.0097 – 0.928	Li <i>et al.</i> (2008)
BPA	Surface waters, the Netherlands	0.2×10^{-5} – 9.3×10^{-5}	Kannan <i>et al.</i> (1998)
	Venetian Lagoon, Italy	0.009 - 1	Vethaak <i>et al.</i> (2005)
	Jiaozhou Bay, China	<0.012 – 0.33	Belfroid <i>et al.</i> (2002)
	Estuaries, Japan	<0.001 – 0.145	Pojana <i>et al.</i> (2007)
	Coastal waters, Singapore	0.001 – 0.092	Fu <i>et al.</i> (2007)
		0.036 – 0.058	Kawahata <i>et al.</i> (2004)
		0.01 – 2.47	Basheer <i>et al.</i> (2004)

Overall, plastic additives have been detected worldwide in estuarine and marine waters at concentrations ranging from pg/L to $\mu\text{g/L}$ with PBDE and DEHP being the most commonly reported congeners among BFR and phthalates, respectively. In addition to BPA and NP are also frequently detected in seawater. As most of the plastic additives exhibit high Kow, higher concentrations are expected in sediment and marine organisms.

3.2.Sediment

As for marine waters, sediments are also affected by anthropogenic discharges and chemicals including plastic additives. Regarding BFRs, multiple BDE congeners have been found in marine sediments with BDE-209 being the major PBDE quantified in most studies at concentrations ranging from ng/kg to mg/kg (Table 7). In the Netherlands, HBCD were also found in sediments from the North Sea and Scheldt Estuary, respectively, at levels of 0.76 to $6.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight (dw) and 30 to $71 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw (Klamer *et al.*, 2005; Verslycke *et al.*, 2005).

Table 7: Concentrations of polybrominated diphenyl ether (PBDE) in marine sediments in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight

Location	Σ PBDE ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight)	Range ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight)	BDE congeners detected	Most abundant congener	References
North Sea, the Netherlands Scheldt Estuary, the Netherlands	126.3	0.4 - 32	BDE-28, -47, -66, -71, -75, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -190, -209	BDE-209	Klamer <i>et al.</i> (2005)
Coastal waters, South Korea	2198	0.2 – 1650	BDE-28, -47, -66, -85, -99, -100, -138, -153, -154, -209	BDE-209	Verslycke <i>et al.</i> (2005)
Industrialized bays, South Korea	27.8	0.0037 – 27.4	BDE-3, -7, -15, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, -138, -153, -154, -183, -209	BDE-209	Moon <i>et al.</i> (2007b)
	357.8	0.0012 - 283	BDE-3, -7, -15, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, -138, -153, -154, -183, -209	BDE-209	Moon <i>et al.</i> (2007a)

TBBPA was also found in the Scheldt Estuary at levels below $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw (Verslycke *et al.*, 2005). In their study, Klamer *et al.* (2005) also reported the presence of phthalates in North Sea sediments, namely dimethyl phthalate (DMP – Pubchem ID: 8554), diethyl phthalate (DEP – Pubchem ID: 6781), DBP, BBP, DEHP and DOP with DEHP being the most concentrated phthalate with 170 to $3,390 \mu\text{g kg}^{-1}$. Phthalates in marine sediments from the Gulf of Mexico were detected on average at 7.6 and $6.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw for di-*n*-butyl phthalate (DnBP – Pubchem ID: 3026) and DEHP respectively (Giam *et al.*, 1978). In Singapore Bay, phthalates reached 890 to $2,790 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw for DEHP (Chee *et al.*, 1996). For nonylphenol (Bergé *et al.*, 2012; David *et al.*, 2009), concentrations ranged from less than $1 \mu\text{g}$

kg^{-1} dw in estuaries in the Netherlands to more than $20,000 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw in the sediments of Tokyo Bay (Table 8). Like BFRs, NP and phthalates, BPA has also been found worldwide in sediments (Table 8). Indeed, BPA concentrations ranged from a few $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in Japan and China to hundreds of $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in the Venetian Lagoon (Table 8).

Whether the plastic additives detected in marine sediments come from diffuse sources (wastewater, atmospheric deposition, sewage sludge, etc.) or leachate from plastic debris is unclear even though an increasing amount of evidence (Al-Odaini *et al.*, 2015) suggests that microplastic and plastic debris in general likely constitute sources of plastic additives in the marine environment.

Table 8: Ranges of concentrations of nonylphenol and BPA in marine sediments in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight. nd: not detected.

Localization	Nonylphenol range ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight)	BPA range ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight)	Reference
North Sea, Germany	13 – 55		Bester <i>et al.</i> (2001)
Estuaries, the Netherlands	0.9 – 1080		Jonkers <i>et al.</i> (2003)
Mediterranean Sea, Spain	18 – 590		Petrovic <i>et al.</i> (2002)
Venetian Lagoon, Italy	47 – 192		Pojana <i>et al.</i> (2007)
Jamaica Bay, US	7 – 13,700		Ferguson <i>et al.</i> (2001)
Southern California Bight, US	130 – 3200		Schlenk <i>et al.</i> (2005)
Masan Bay, South Korea	92 – 557		Li <i>et al.</i> (2008)
Tokyo Bay, Japan	142 – 20,700		Kurihara <i>et al.</i> (2007)
	120 - 640		Isobe <i>et al.</i> (2001)
The Netherlands		<1.1 - 43	Vethaak <i>et al.</i> (2005)
Venetian Lagoon, Italy		<2.0 – 118	Pojana <i>et al.</i> (2007)
Jiaozhou Bay, China		0.7 – 17	Fu <i>et al.</i> (2007)
Estuaries, Japan		nd – 2.7	Kawahata <i>et al.</i> (2004)

3.3. Microplastics

To date, only a few studies have focused on the detection of plastic additives from MP collected in marine environments (Faure *et al.*, 2015; Fries *et al.*, 2013; Hirai *et al.*, 2011; Mato *et al.*, 2001; Rani *et al.*, 2015; Rochman *et al.*, 2014). Mato *et al.* (2001) detected nonylphenols in PP pellets deployed in Tokyo Bay and suggested that these compounds came from plastic additives found in the PP pellets themselves. In another study, Hirai *et al.* (2011) measured high concentrations of PBDEs, BPA and nonylphenols in PE and PP fragments collected on remote or urban beaches and in the open ocean. It was stated that they originated from plastic additives used for the manufacture of PP and PE. A wide range of plastic additives were also identified using Pyrolysis-GC/MS with thermal desorption in MP collected from sediment of Norderney Island (Fries *et al.*, 2013). MP particles were identified as PE, PP, PS and polyamide-6 (PA-6). They were associated with DEHP, DnBP, diisobutyl phthalate (DiBP – Pubchem ID: 6782), and 2,4-di-*tert*-butylphenol (2,4-DTBP – Pubchem ID: 7311), used here as antioxidant additives for PE and PP, DnBP, DiBP, DEP and DMP for PS, and DEHP, and DiBP and DEP for PA-6 (Fries *et al.*, 2013). Moreover, Rani *et al.* (2015) detected multiple plastic additives in plastic marine debris found on a beach in Geoje, South Korea. Indeed, the authors found BPA and phthalates in PP and PE plastic marine debris as well as antioxidants including Irganox 76 and 2,4-DTBP in PP and PE plastic marine debris. In a study dealing with plastic debris in the Atlantic Ocean, BPA, PBDEs and 4-nonylphenol were detected in plastic samples found at sea and the authors suggested that this chemical came mainly from plastic additives (Rochman *et al.*, 2014). Moreover, some plastic additives were detected at concentrations up to 6 orders of magnitude higher than the concentrations measured in the surrounding water (Rochman *et al.*, 2014). In a more recent study, Faure *et al.* (2015) quantified MP pollution in Swiss lakes and detected MP associated with plastic additives including

PBDEs, NPs, BPA and phthalates at concentrations comparable to those reported in marine studies (from 10^{-1} to 10^6 ng g⁻¹) (Faure *et al.*, 2015).

These six studies demonstrated that plastic additives, some of which are known to be potential endocrine disruptors, are quantifiable in MPs found in sediments or in marine waters, suggesting that leaching of additives occurs in the environment. This is clearly of great concern as microplastics exhibit a high propensity to enter all trophic levels due to their small size and ubiquity in marine environments, and given the fact that leaching may also occur in the digestive conditions of organisms upon MP ingestion.

4. Transfer and toxicity of plastics additives for marine organisms

4.1. Contamination of marine organisms by plastic additives

PBDE have been detected in tissues of numerous marine organisms such as bivalves (Σ_{13} BDE ranged from 6.6 to 440 $\mu\text{g kg}^{-1}$ lipid weight) (Bellas *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2006; Ramu *et al.*, 2007), fish (Σ_7 BDE ranged from 30.6 to 281 $\mu\text{g kg}^{-1}$ lipid weight) (Peng *et al.*, 2007) and mammals (around 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wet weight (ww) in sperm whale (*Physeter microcephalus*) blubber) (de Boer *et al.*, 1998), suggesting that transfer from seawater, food or plastics to organisms occurs. In their work on the contamination of the Scheldt Estuary, Verslycke *et al.* (2005) found PBDE in sediment and in mysid shrimp (*Neomysis integer*) living in this estuary (Σ_{10} BDE: 2095 to 3562 ng g⁻¹ lipid weight), and they highlighted that bioaccumulation was highest for BDE-47, -99 and -100 and lowest for BDE-209 because (i) highest brominated accumulate slower than lowest brominated congeners in the marine environment and (ii) they can be debrominated photolytically or biologically (Verslycke *et al.*, 2005). Phthalates (DMP, DEP, DiBP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP, DnNP) were found in a wide range of organisms, including 18 different species ranging from primary producers

(plankton and macroalgae) to picked dogfish (*Squalus acanthias*), but no biomagnification of the studied phthalates was observed through the food web (Mackintosh *et al.*, 2004). Recently, Cheng *et al.* (2013) also detected phthalates (DMP, DEP, dipropyl phthalate (DPRP – PubChem ID: 8559), DiBP, DnBP, 2-Methoxyethyl phthalate (DMEP – PubChem ID: 8344), DHP, BBP, DEHP, DOHP, DnOP, DNP+DiDP) in fish at concentrations ranging from 0.2 to 1.23 $\mu\text{g g}^{-1}$ ww (Cheng *et al.*, 2013). NP has been detected in many organisms commonly consumed as seafood products including oysters (*Crassostrea gigas*) (Cheng *et al.*, 2006), mussels (*Perna perna*) (Isobe *et al.*, 2007) and fishes (Ferrara *et al.*, 2008). For instance, Basheer *et al.* (2004) found NP and BPA in multiple fresh seafood products, including prawns (*Penaeus monodon*), crabs (*Portunus pelagicus*), blood cockles (*Anadara granosa*), white clams (*Meretrix meretrix*), squid (*Loligo sp.*) and fish (*Decapterus russelli*), from a supermarket in Singapore.

Overall, these results suggest that contamination of marine organisms by plastic additives may occur *via* natural pathways (*i.e.* waterborne or foodborne exposure) or *via* ingestion of plastic debris including MP.

4.2. Plastics additive transfer to marine organisms

4.2.1. Evidence from laboratory

To investigate the potential leaching of additives from MP in environments characterized by different conditions (pH, temperature, salinity, etc), several laboratory studies have been conducted over the last years. First, the influence of gut surfactant was tested on the desorption of adsorbed chemicals, including perfluorooctanoic acid (PFOA – Pubchem ID: 9554) and DEHP, from PVC and PE in a study undertaken by Bakir *et al.* (2014). Desorption was higher in gut surfactant at 38°C (*i.e.* warm blooded animals) than in gut surfactant at 18°C (*i.e.* cold blooded animals) and in seawater at 18°C for DEHP. PFOA exhibited low affinity for PVC or PE regardless of the surfactant (Bakir *et al.*, 2014).

The same authors suggested that the passage of plastic through the gut could enhance desorption of pollutants and act as a transfer route for accumulation of these pollutants. However, in a more recent study, Bakir *et al.* (2016) demonstrated, using a one-compartment model, that MP do not provide an additional pathway for the transfer of adsorbed chemicals, including DEHP and PFOA, from seawater to marine organisms even if MP transits through the gut. Some laboratory studies have used MP in the presence of additives to determine if these chemicals can transfer to organisms. For instance, Chua *et al.* (2014) exposed the marine amphipod *Allorchestes compressa* to PBDE in the presence or absence of microbeads with PBDEs adsorbed on microbeads. Both microbead ingestion and PBDE transfer *via* the microbeads were demonstrated at the end of the exposure. However, concentrations of PBDEs were lower in amphipods exposed to PBDE adsorbed on microbeads than in amphipods exposed to PBDEs without microbeads (Chua *et al.*, 2014) suggesting that transfer of PBDE adsorbed on MP can occur but at a lesser extent than the transfer via water. Similarly, Wardrop *et al.* (2016) exposed rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*) to microbeads spiked with PBDEs (BDE-28, -47, -100, -99, -153, -154, -183 and -209) and compared them to control fish and fish exposed to microbeads alone. Here, PBDEs were analyzed in fish tissues excluding the stomach, liver, gall bladder and gonads to exclude spiked microbeads from the PBDEs analyses. During exposure, fish exposed to microbeads spiked with PBDEs showed higher concentrations than the two controls, and lower brominated congeners were better transferred in fish tissues than higher brominated congeners. On the other hand control fish and fish exposed to PBDE-free microbeads showed the same low levels of PBDEs concentration in their tissues suggesting that MP do not reduce contaminant body burden as it was previously hypothesized (Koelmans *et al.*, 2013a, b; Koelmans *et al.*, 2016). More realistic experiments have been performed using plastics incubated or collected in natural environments. For instance Rochman *et al.* (2013) used low-

density polyethylene (LDPE) pellets deployed in seawater for two months and showed that the LDPE pellets adsorbed chemicals from the surrounding environment. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to these pellets resulted in the accumulation of significant amounts of PBDEs and was associated with liver toxicity and pathology including glycogen depletion and cell necrosis for example (Rochman *et al.*, 2013). Bioaccumulation of PBDEs was also demonstrated in a terrestrial invertebrate, the house cricket (*Acheta domesticus*), as a result of PUR foam ingestion (Gaylor *et al.*, 2012). Another laboratory study demonstrated that the transfer of nonylphenol, triclosan and PBDE-47 can occur *via* MP ingestion in the lugworm (*Arenicola marina*) with possible effects on lugworm behavior (Browne *et al.*, 2013). Overall, these laboratory experiments demonstrated transfer of plastic additives upon MP ingestion, sometimes in association with toxicity or behavior change.

4.2.2. Evidence from field studies

Levels of accumulated plastic additives in the environment or organisms have often been considered as a proxy indicator of plastic exposure in the marine environment as a consequence of the release of additives from plastic debris. For instance, a study on *Puffinus tenuirostris* showed that this bird ingested plastics at sea and that these plastics transferred flame retardant additives (PBDE) including BDE-209, which is specific to plastic (Tanaka *et al.*, 2013). In another study, the authors demonstrated that the transfer of PBDE may occur mainly by plastic ingestion through exposure by prey ingestion (Tanaka *et al.*, 2015). In another study, Rochman *et al.* (2014) examined the possible relationship between plastic densities at sea and levels of chemicals in fish inhabiting those areas. The results showed that PBDEs, especially the highest brominated congeners (BDE-209), may be an indicator of plastic pollution as previously suggested (Tanaka *et al.*, 2013). In the North Pacific Gyre,

yellowtail (*Seriola lalandi*) were sampled to evaluate levels of plastic in the stomach and concentrations of pollutants and additives in their tissues (Gassel *et al.*, 2013). Ten percent of the yellowtail had ingested plastics, and PBDE and nonylphenol were concomitantly found in the fish tissues (Gassel *et al.*, 2013). Gassel *et al.* (2013) suggested that contamination of fish by nonylphenol and PBDE-209 could originate from the ingested plastic as mentioned above (Hirai *et al.*, 2011; Rochman *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2013; Teuten *et al.*, 2009). Other chemicals are also used as proxies for MP contamination such as DEHP (Fossi *et al.*, 2012; Fossi *et al.*, 2014; Fossi *et al.*, 2016). More recently, a study showed a higher accumulation of HBCDs in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) inhabiting styrofoam debris (EPS) in comparison with mussels living on other plastic debris or rocks (Jang *et al.*, 2016). The authors also suggested that the isomeric profiles of detected HBCDs support the transfer of this flame retardant from the styrofoam debris to mussels through ingestion of EPS particles.

Field surveys showed that MP ingestion may constitute another route of transfer of plastic additives in marine organisms, leading to the use of plastic additives tissue content (mainly BDE-209 and DEHP) as a proxy for plastic exposure or ingestion.

4.3. Toxicity of plastic additives demonstrated by leaching experiments

Evidence for plastic toxicity has been rising in the last years. While direct toxicity can occur due to the physical impacts of plastic ingestion (for a review, see Wright *et al.* (2013a)), indirect toxicity may be observed in relation to the release of hazardous chemicals from plastics. As most plastic additives are not chemically but physically bound to the plastic, they can be released into the environment and become available to organisms. Recent studies demonstrated, using leaching experiments, that various plastics are toxic to a wide range of organisms (Table 9).

Table 9: list of aquatic species, plastic polymer types, exposure times and endpoints used in various leaching experiments

Species	Plastic type	Exposure time	Exposure level	Endpoints	Reference
<i>Daphnia magna</i>	PC, PVC, PU, PE, LDPE, PMMA, PET, HDPE, PTFE, ABS, PP, MDPE	24 and 48 hours	70 – 100 g L ⁻¹	Mortality	Lithner et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	PP, HDPE, PVC, ABS, Epoxy resin	24 and 48 hours	Up to 250 g L ⁻¹	Mortality	Lithner et al. (2012)
<i>Nitroca sinipes</i>	PP, PVC, PS, PET, PUR, LDPE, HDPE, ABS, PLA, Unknown	96 hours	100 g L ⁻¹	Mortality	Bejgarn et al. (2015)
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	PET, HDPE, PVC, LDPE, PP, PS, PC	24, 48, 72 and 96 hours	0.1 – 0.5 m ² L ⁻¹	Settlement	Li et al. (2016a)
<i>Perna perna</i>	Virgin (PP) and beached pellets	48 hours	25% of pellets (v/v)	Embryo development	Gandara e Silva et al. (2016)
<i>Pseudochromis fridmani</i>	PE (two different origins)	48 hours	-	Mortality	Hamlin et al. (2015)

ABS: Acrylonitrile butadiene styrene; PC: Polycarbonate; PE: Polyethylene; LDPE: Low-Density Polyethylene; MDPE: Medium-Density Polyethylene; HDPE: High-Density Polyethylene; PET: Polyethylene terephthalate; PLA: Poly Lactic Acid; PMMA: Polymethyl Methacrylate; PP: Polypropylene; PTFE: Polytetrafluoroethylene; PU: Polyurethane; PVC: Polyvinyl Chloride

Li *et al.* (2016a) used the seven categories of recyclable plastics (High Density PE (HDPE), LDPE, PP, PVC, Polycarbonate (PC), PET and PS) to quantify the impact of their leachate on the survival and settlement of barnacle *Amphibalanus amphitrite* larvae. Leachates were prepared by placing 1 x 1 cm pieces of each plastic in 20 mL of filtered seawater for 24h at 28°C (Li *et al.*, 2016a). Survival was significantly lowered at the highest leachate concentration (0.10 and 0.50 m² of plastic material L⁻¹) for all plastics and PVC was the most toxic plastic for *A. Amphitrite* larvae. Additionally, settlement was also inhibited with all plastics leachates (Li *et al.*, 2016a). Similarly, Bejgarn *et al.* (2015) exposed the copepod *Nitocra sinipes* to the leachate of weathered or non-weathered plastics. Here, leaching experiments were performed with leachates prepared with 10 g of each plastic placed in 100 mL of brackish seawater from the Baltic rotating at 6-21 rpm for 72h in the dark (Bejgarn *et al.*, 2015). Of the twenty-one plastics tested, eight (DVD-case (PP), biodegradable bag, costume-(PVC), flyswatter packaging (PVC), computer housing (unknown), garden hose (PVC), car dashboard (unknown) and phone cover (PUR)) demonstrated toxicity (mortality after 96h) to *N. sinipes*, and after weathering, toxicity either increased or decreased depending on the plastics (Bejgarn *et al.*, 2015). Two leaching studies were carried out on the copepod *Daphnia magna* (Lithner *et al.*, 2012; Lithner *et al.*, 2009), a common organism used in ecotoxicological studies. Lithner *et al.* (2009) prepared their leachates by placing plastic pieces in deionized water to obtain a liquid to solid ratio of 10 L kg⁻¹ which was horizontally shaken at 60 rpm for 24h (16h of fluorescent light and 8h of darkness) at 20°C. Out of the thirty-two plastics tested only nine, including five composed of PVC, showed acute toxicity (immobility after 24 and 48h ; EC₅₀ ranging from 5 to 80 g plastic material L⁻¹) to *D. magna* and it has been suggested that the toxicity of PVC was due to the phthalate content (Lithner *et al.*, 2009). In a second study, Lithner *et al.* (2012) used PP, PE, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) and epoxy resin, and

they prepared their leachates by adding 250 g of plastic in 1 L of deionized water shaken at 90 rpm at 50°C for 3 days. As previously demonstrated, PVC caused acute toxicity (immobility after 24 and 48h ; EC₅₀ ranging from 2-235 g plastic material L⁻¹) probably in relation to its phthalate leachates, however the acute toxicity observed with the epoxy resin was not attributed to a specific chemical compound (Lithner *et al.*, 2012). A more recent study evaluated the toxicity of virgin and beached pellets on the embryo development of brown mussels (*Perna perna*) (Gandara e Silva *et al.*, 2016). Here, the authors exposed the brown mussel embryo to 2 mL of virgin (PP) or beached (42% PE and 58% unknown composition) pellets in 8 mL of seawater, and toxicity was assessed by determining the percentage of dead or abnormal embryos (Gandara e Silva *et al.*, 2016). The leaching experiment led to 23.5% and 100% dead or abnormal embryos for virgin and beached pellets, respectively. It has been suggested that the difference in toxicity was mainly due to the difference in the chemical load of the pellets used (Gandara e Silva *et al.*, 2016). Beached pellets were exposed to *in situ* contamination leading to adsorption of pollutants and to additives already found inside the polymeric matrix. These leaching experiments showed that plastic leachates and especially PVC leachates (*i.e.* phthalates) can lead to adverse effects on organisms. However, the toxicity highlighted in these five experiments was not attributed to specific chemical compounds (Bejgarn *et al.*, 2015; Gandara e Silva *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a; Lithner *et al.*, 2012; Lithner *et al.*, 2009). As suggested by Li *et al.* (2016a), chemical identification should be undertaken during leaching experiments with a focus on plastic additives in order to identify the compound or its degradation products responsible for the observed toxicity. For instance, a more recent leaching study focused on the effects of nonylphenol on the coral reef fish *Pseudochromis fridmani* by exposing single fish to the leachate of plastic bags made of two PE (PE1 and PE2) from different manufacturers for 48h (Hamlin *et al.*, 2015). Nonylphenol leached in the water at

higher concentrations for PE2 than for PE1; with respectively 41.0 ± 5.5 and $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g L}^{-1}$, and 60% and 11% of the fish died after 48 hours of exposure to leachates from PE2 and PE1, respectively. However, Hamlin *et al.* (2015) only focused their work on nonylphenol and did not study PE1 and PE2 compositions in terms of other additive contents. This study demonstrated that exposing fish to two identical plastic polymers (PE) may result in drastically different outcomes, as the plastic additives incorporated in each plastics are dependent on the plastic manufacturer and most of the time, their exact compositions remain unknown (Hamlin *et al.*, 2015). Studies are required to explore potential differences between plastics from different manufacturers and toxicity related to the diversity of chemicals used in the plastic industry.

Exposure experiments based on leaching processes conducted on a wide range of polymers and target organisms confirmed toxicity of plastics additives, which highlights the need for non-target screening analysis covering a broad range of chemicals in order to better identify the main compound(s) responsible for the toxicity.

4.4. Relative importance of HOC in comparison with plastic additives: case of modelling studies

The high affinity of plastic polymers for HOC has been demonstrated in numerous laboratory experiments (Bakir *et al.*, 2014; Teuten *et al.*, 2007), and an increasing number of studies have focused on the role of MP as a vector for HOC in marine organisms (Besseling *et al.*, 2013; Rochman *et al.*, 2013). However, recent studies have suggested that given (i) baseline contamination levels of seawater and marine organisms, and (ii) the low abundance of plastic particles relative to other suspended particles found in oceans (such as organic matter, plankton, detritus etc), exposure to HOC *via* plastic may be negligible compared to natural pathways (Bakir *et al.*, 2016; Beckingham *et al.*, 2017; Koelmans *et al.*, 2013a, b; Koelmans *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2016). Moreover, Koelmans *et al.* (2016) suggested that MPs ingestion by marine biota does not increase

their exposure to HOCs and could have a cleaning effect while concerns have arisen regarding risk due to plastic additives.

So far most modelling studies have focused their work on adsorbed HOC (Bakir *et al.*, 2016; Koelmans *et al.*, 2016). However, no model is yet available on the transport and fate of plastic additives leaching from plastic debris although (i) plastic additives can be added in very high concentration depending on the application; and (ii) transfer of plastic additives to marine organism upon plastic ingestion has been demonstrated both in laboratory experiments and in field studies. It highlights the need to include these chemicals in future modelling work in order to better clarify their potential for transfer.

5. Conclusion

Plastic additives associated with MP have received less attention than HOC adsorbed on MPs and the present review highlighted the need for upcoming studies to better characterize plastic additives associated with microplastics found at sea as well as their potential release in environmental matrices. As PE and PP are the main plastic debris found at sea, these two polymers should be investigated alongside with PVC due to its particularly high concentration in hazardous additives. Non-target screening analysis is required to identify the broad range of plastic additives leaching from these polymers and to better identify the main compound(s) responsible for toxicity. In addition, special attention should definitely be paid to hazardous plastic additives known to be major endocrine disruptor, namely bisphenol A and phthalates. Experimental and modelling studies are required to better characterize (i) the transfer of plastic additives upon MP ingestion relative to waterborne and foodborne exposure, and (ii) the effects of plastic additives on marine organisms. Such experiments should be realized using standardized “laboratory-made” MP, in which plastic additives are well characterized and introduced in controlled amounts reflecting industrial processes. The impacts of ageing plastic under realistic conditions on the transfer of plastic additives also need to be evaluated to

investigate more environmentally relevant scenarios.

Acknowledgments

Ludovic Hermabessiere is grateful to the Hauts-de-France Region and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) for the financial support of his PhD. This work was funded by ANSES through a “Convention de Recherche et Développement” (2015-CRD-11). This paper was also supported by the CESA of the French National Research Agency (ANR) (ANR-15-CE34-0006-02), as part of the NANOPLASTICS project. Authors also thank James Marchant for his helpful revision of English and his comments on the manuscript.

**Annexe 2 : Fichier type de prise en compte des blancs dans le comptage des microplastiques dans les TD et les filets
des poissons**

n° Ech	Comptage MP échantillons														Comptage MP blanc manip														
	fragments														témoin air dissection														
	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente	TOTAL	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente
BM_So_013_TD	1		1										2	4	3														3
BM_So_014_TD										1				1	3														3
BM_So_015_TD													1	1	3														3
BM_So_016_TD													1	1	3														3
BM_So_017_TD														0	1	1													2
BM_So_018_TD						1				1	1			3	1	1													2
BM_So_019_TD			2			1				1	2			6	1	1													2
BM_So_020_TD														0	1	1													2
BM_So_021_TD						1								1	3									1	2				6
BM_So_022_TD														0	3									1	2				6

n° Ech	Comptage MP blanc manip																												
	témoin air digestion														témoin KOH														
	fragments														fragments														
	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente	TOTAL	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente
BM_So_013_TD														0													1	1	
BM_So_014_TD														0													1	1	
BM_So_015_TD														0													1	1	
BM_So_016_TD														0													1	1	
BM_So_017_TD														0													1	1	
BM_So_018_TD														0													1	1	
BM_So_019_TD														0													1	1	
BM_So_020_TD														0													1	1	
BM_So_021_TD														0													1	1	
BM_So_022_TD														0													1	1	

n° Ech	Comptage MP blanc manip														Comptages corrigés														
	témoin air filtration																												
	fragments														fragments														
	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente	TOTAL	Noires	Grises	Blanches	Bleues	Bleues clair	Orange	Beige	Rouge	Rose	Jaune	Marron	Violette	Verte	Transparente
BM_So_013_TD														0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
BM_So_014_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
BM_So_015_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM_So_016_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM_So_017_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM_So_018_TD														0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3	
BM_So_019_TD														0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	6	
BM_So_020_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM_So_021_TD														0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
BM_So_022_TD														0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Résumé

L'augmentation de la production de matière plastique depuis les années 1950 combinée à une mauvaise gestion des déchets plastiques ainsi qu'aux mauvais comportements des citoyens conduit à la contamination des écosystèmes terrestres comme marins. L'ingestion par des organismes marins de particules plastiques mesurant moins de 5 mm, appelées microplastiques, a été décrite. L'objectif de ces travaux de thèse était d'évaluer le danger « microplastique » pour le consommateur de produits de la pêche. Afin de répondre à cet objectif, la sélection et la caractérisation d'une méthode permettant de digérer les tissus des produits de la pêche a été. En parallèle, une méthode de Pyrolyse-GC/MS a été optimisée afin d'identifier les microplastiques les plus petits possibles. Ses limites d'applications ont été calculées puis la méthode a été appliquée sur des microplastiques provenant de différents produits de la pêche. Ces deux méthodes ont été appliquées dans la recherche de microplastiques dans deux espèces de bivalves et trois espèces de poissons. Pour les bivalves, la contamination aux microplastiques était comprise entre 0,15 et 0,74 MP/g de chair humide alors que pour les poissons la contamination était assez faible : 0,01 MP/g de tractus gastro-intestinal et 0,001 MP/g de filet. Pour finir, une étude exploratoire de la lixiviation d'un additif plastique en utilisant un modèle de digestion *in vitro* a été entreprise. Globalement, ces travaux de thèse permettent de proposer des voies d'harmonisation des méthodes pour l'étude des microplastiques dans les produits de la pêche pour, *in fine*, évaluer le danger pour le consommateur.

Mots-clés : microplastique, développement de méthodes, Pyrolyse-GC/MS, produits de la pêche, additif plastique

Abstract

Increase in plastic production since the 1950's in combination with plastic waste mismanagement lead to the presence of plastic particle in terrestrial and marine environment. Plastic particles measuring less than 5 mm, called microplastics, are ingested by a wide range of organisms. The goal of this PhD thesis was to evaluate the microplastic hazard for seafood consumers. Firstly, method for digesting seafood tissue without degrading plastic polymer was selected and applications limits were determined for digestion of fish digestive tracts. Concurrently, a Pyrolysis-GC/MS method was optimized, limit of detection were determined and this method was applied on environmental samples. Both methods were used to study microplastics contamination in bivalve and fish species used for human consumption. Bivalve contamination was between 0.15 and 0.74 MP/g of tissue wet weight whereas contaminations in fish were low. Indeed, digestive tracts were contaminated by in mean 0.01 MP/g of tissue wet weight and muscles were contaminated by in mean 0.001 MP/g of tissue wet weight. Lately, leaching of a plastic additive was studied using an *in vitro* enzymatic model of digestion. However, such phenomenon was not highlighted. Overall, these results will help to standardize the study of microplastics in seafood products.

Keywords: microplastics, methods developments, Pyrolysis-GC/MS, seafood products, plastic additive