



HAL
open science

Caractérisation du comportement de nanoplastiques représentatifs de l'environnement dans un gradient de salinité : évaluation de leurs impacts écotoxicologiques sur les huitres de palétuviers *Isognomon alatus*

Zélie Venel

► **To cite this version:**

Zélie Venel. Caractérisation du comportement de nanoplastiques représentatifs de l'environnement dans un gradient de salinité : évaluation de leurs impacts écotoxicologiques sur les huitres de palétuviers *Isognomon alatus*. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0072 . tel-03582005

HAL Id: tel-03582005

<https://theses.hal.science/tel-03582005v1>

Submitted on 21 Feb 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences et Environnements

SPÉCIALITÉ Géochimie et écotoxicologie

Par Zélie VENEL

**Caractérisation du comportement de nanoplastiques
représentatifs de l'environnement dans un gradient
de salinité - évaluation de leurs impacts
écotoxicologiques sur les huîtres de palétuviers
*Isognomon alatus***

Sous la direction de : Magalie BAUDRIMONT

Co-directeur : Julien GIGAULT

Soutenue le 16 juillet 2020

Membres du jury :

M. CACHOT Jérôme	Professeur	Université de Bordeaux	Président
M. GRASSL Bruno	Professeur	Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
Mme. MOUNEYRAC Catherine	Vice recteur Recherche et Valorisation	Université Catholique de l'Ouest	Rapporteur
Mme. DAVRANCHE Mélanie	Professeur	Université de Rennes 1	Rapporteur
M. CACHOT Jérôme	Professeur	Université de Bordeaux	Examineur
M. JACOB David	Directeur technique	Cordouan Technologies	Responsable scientifique
M. MAXIT Benoit	Responsable de laboratoire	Cordouan Technologies	Invité

Titre : Caractérisation du comportement de nanoplastiques représentatifs de l'environnement dans un gradient de salinité - évaluation de leurs impacts écotoxicologiques sur les huîtres de palétuviers *Isognomon alatus*

Résumé :

La pollution mondiale des eaux de surface par les plastiques ne cesse de croître et soulève des problèmes économiques et écologiques. D'après de récentes études, les macro-déchets plastiques marins se dégradent en microparticules puis en nanoparticules par des effets mécaniques et photochimiques. La fraction nanométrique des plastiques environnementaux est encore inconnue car cela reste un challenge analytique pour les caractériser à l'état d'ultra-trace. Ces particules sont potentiellement toxiques par leur composition, leur taille et leur forme, mais peuvent le devenir encore plus, par l'agrégation avec de la matière organique, ou bien par l'adsorption de métaux trace ou de polluants organiques à leur surface. Le comportement des nanoplastiques dans les eaux de transition comme les estuaires ou les mangroves est encore méconnu et peu étudié. Le but de cette thèse est de (i) caractériser le comportement physico-chimique de nanoparticules de plastiques modèles dans un gradient de salinité, avec une technique originale utilisant la microfluidique ; (ii) étudier l'impact écotoxicologique de ces nanoparticules sur des bivalves, avec un mode d'exposition représentatif des conditions d'exposition *in situ*. Des latex de polystyrène, ainsi que des nanoplastiques mécaniquement vieillis provenant soit de pellets de polystyrène, soit de macroplastiques prélevés sur des plages de Guadeloupe (polyéthylène, polypropylène), ont été soumis à un gradient de salinité dans des conditions dynamiques à l'intérieur de micro-puces. Les résultats ont été comparés à ceux des protocoles classiques qui consistent à disperser des nanosphères standards dans un milieu salin homogène en condition statique. Les tailles, concentrations, morphologies et stabilité de ces nanoparticules, ont été mesurées en fonction des conditions physico-chimiques du milieu.

L'impact écotoxicologique des nanoplastiques modèles, dispersés via un gradient de salinité, a ensuite été étudié sur des huîtres des palétuviers : *Isognomon alatus*. Les expositions ont été réalisées par voie directe à des concentrations environnementales. Différents marqueurs tels que la production de métallothionéines et l'expression précoce des gènes ont été utilisées pour évaluer la toxicité des nanoplastiques. Cette thèse a également permis le développement d'un des instruments les plus sensibles pour l'analyse de nanoparticules à l'état d'ultra-traces : la détection de plasmas induits par laser (LIBD). Ces travaux mettent en évidence l'impact des gradients de salinité sur le comportement des nanoplastiques et leur importance dans l'évaluation de la toxicité sur les bivalves lors de la transition eau douce-eau de mer.

Mots clés : Nanoplastiques ; Gradient de salinité ; Microfluidique ; Ecotoxicologie aquatique ; Huître de palétuvier ; Détection de plasmas induits par laser ; Diffusion dynamique de la lumière.

Title : Characterization of environmentally representative nanoplastics behavior across a salinity gradient - assessment of their ecotoxicological impacts on flat tree oysters *Isognomon alatus*

Abstract :

Plastic pollution of surface water is constantly increasing and raises economic and ecological problems. According to recent studies, marine plastic debris breaks down into microparticles and nanoparticles by mechanical and photochemical processes. The nanometric fraction of environmental plastics is still unknown because there are still analytical challenges to characterize nanoparticles at trace concentrations. These particles are potentially toxic due to their composition, size and shape, but can become even more toxic, by aggregation with organic matter, or by surface adsorption of trace metals or organic contaminants. Up to date, there is limited studies about behavior of nanoplastics in transitional waters such as estuaries and mangroves. The aim of this thesis is to (i) characterize physico-chemical behavior of nanoplastic models in a salinity gradient, with an innovative methodology using microfluidics; (ii) study the ecotoxicological impact of these nanoparticles on bivalves, with an exposure representative of *in situ* conditions.

Polystyrene latex, as well as mechanically aged nanoplastics from either pristine polystyrene pellets or from macro-plastics sampled on Guadeloupe beaches (polyethylene, polypropylene), were dispersed across a salinity gradient under dynamic conditions inside a microchip. Results were compared with conventional protocols i.e. dispersing standard nanospheres in a homogeneous saline medium under static conditions. Sizes, concentrations, morphologies, compositions and stability of these nanoparticles were measured as a function of the physicochemical conditions of the medium. Then, the ecotoxicological impact of model nanoplastics dispersed via a salinity gradient was studied on flat tree oysters: *Isognomon alatus*. Exposures were carried out by direct route at environmental concentrations. Different markers such as metallothionein production and early gene expression have been used to assess the toxicity of nanoplastics. This thesis also allowed the development of one of the most sensitive instruments for the analysis of nanoparticles at ultra-trace concentration: the Laser Induced Breakdown Detection (LIBD). This work highlights the impact of salinity gradients on the behavior of nanoplastics and its importance in the toxicity assessment on bivalves during the transition from freshwater to seawater.

Keywords :

Nanoplastics ; Salinity gradient ; Microfluidics; Aquatic ecotoxicology ; *Isognomon alatus*; Laser Induced Breakdown Detection ; Dynamic light scattering

Unité de recherche

[EPOC, UMR CNRS 5805, Station Marine d'Arcachon, Université de Bordeaux, Place du Docteur Bertrand Peyneau, 33120 ARCACHON]

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration par leurs encouragements et leur soutien.

Je remercie tout d'abord Sylvain Boj de Cordouan Technologies, Antoine Grémare, du laboratoire EPOC de l'université de Bordeaux et Olivier Dauteuil du laboratoire Géoscience de l'université de Rennes 1 de m'avoir accueillis dans leurs locaux,

Un grand merci à mon trio de chefs : Julien Gigault, Magalie Baudrimont, et Boris Pedrono. Chacun de vous a été présent à des moments différents mais clefs de ma thèse pour fournir conseils, écoute et soutien tout en me laissant suffisamment d'autonomie pour gérer ces recherches. Julien et Magalie, je vous suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de corriger mon manuscrit avec rapidité et efficacité.

Je souhaite remercier Cordouan Technologies et le l'agence Nationale de la recherche via le Projet PEPSEA sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu.

Je souhaite remercier les membres du jury Catherine Mouneyrac, Bruno Grassl, Mélanie Davranche et Jérôme cachot d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont également à mon comité de thèse dont Agnes Feurtet Mazelle, Jérôme Rose font parti, pour m'avoir guidé à des moments clés de ma thèse.

Ce travail de thèse à l'interface de plusieurs disciplines m'a amené à rencontrer des gens de tous horizons et spécialités, et chaque rencontre a été extrêmement enrichissante. En effet durant ces quelques années j'ai été amenée à travailler sur 3 sites, à Bordeaux et à Rennes.

Je tiens donc à remercier les membres de l'entreprise Cordouan Technologies, pour leurs enseignements et leurs conseils en optique, physico-chimie et en rédaction de thèse : Sylvain Boj, David Jacob, Benoit Maxit, Hind El Hadri. Un remerciement spécial à Patrice Nagtegael qui m'a formé sur la LIBD. Merci à Hind, Maëlle, Meghna, Charlotte et Loriane pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Merci également à Thomas Bayle de chez Lasea pour tous ses conseils en optique et le prêt de matériel et au Laboratoire du Futur pour m'avoir prêté un four à plasma pour faire des micropuces.

Je souhaite ensuite remercier les membres du laboratoire EPOC qui m'ont permis de mener à bien mes travaux d'écotoxicologie : Patrice Gonzales, Cerise Daffe et Anthony Bertucci pour leurs enseignements en génétique, Pierre Yves Gourves et Emilie Dassié pour les analyses de métaux, Natalie Mesmer Dudons pour sa formation en microscopie électronique. Un grand merci à Bruno Etcheverria pour sa patience et son soutien pour la maintenance des cultures d'algues et des huitres de mangroves. Je voudrais tout particulièrement remercier Marc Lebordais et Adeline Arini avec qui ce fut un plaisir de travailler, même dans les conditions les plus dures, qui ont été pour moi d'un soutien sans faille, et sans qui je n'aurais pas tenu

psychologiquement dans les moments difficiles. Je voudrais remercier les autres garants de mon moral qui ont marqué les meilleurs mois que j'ai passé au laboratoire EPOC : Tiaré, Océane, Alison, Pauline, Maëliiss, Joy et tous les autres.

Je remercie également les membres de l'IRPREM de Pau pour leurs conseils et la sythèse de PSL, en particulier Bruno Grassl et Stéphanie Raynaud.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe de Géosciences Rennes, Mélanie Davranche, Anne Catherine Pierson-Wickmann, Rémi Marsac, Mathieu Pedrot, Martine Bouhnik-Le Coz, et Patrice Petitjean. Un remerciement spécial à Dominique Bavay pour le temps passé à développer le logiciel du Magellan, les bricolages de labo pour monter les expérimentations, la réparation de mon ordinateur et les bons moments de discussion.

Je remercie également les stagiaires, thésards et post doc de la Team Plastic avec qui j'ai adoré travailler et grace à qui j'ai passé un super séjour à Rennes : Alice, Caroline, Florent, Elahé, Corentin, Chloé, Anthony, Linh, et Laura Rowenzyk (quand tu es venue à Rennes). Tout ça sans compter sur les parties de Tarot le midi et les soirées, avec Mathilde, Luc, Rémi, Nathaline, Christian, Julien, Romain, Alexandre, Jessica, Jan et tous les autres !

Je souhaite remercier Hervé Tabuteau pour son énorme contribution aux travaux de microfluidique et Nolween pour son aide pendant les mannips.

Enfin je souhaite remercier ma famille, mes amis et mon conjoint, pour leur soutien sans faille leur patience, et leurs encouragements.

Sommaire

Sommaire	6
Index des abréviations	9
Valorisation des travaux de thèse	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
CHAPITRE 1 : État de l'art	14
I Le problème des déchets plastiques	14
I.1 La pollution par les plastiques	14
I.2 Problèmes sociétaux et économiques causés par les déchets plastiques	18
I.3 Microplastiques et nanoplastiques	19
I.4 Toxicité des microplastiques	20
I.5 Toxicité des nanoparticules de plastique	22
I.6 Toxicité due aux additifs	28
I.7 Effet « cheval de Troie »	29
II Problématique	31
II.1 Non représentativité des modèles utilisés	31
II.2 Concentrations non représentatives	33
II.3 Dispersion dans les milieux non représentative	34
III Propriétés et caractéristiques des nanoparticules	36
III.1 Introduction à la stabilité colloïdale	36
III.2 Les caractéristiques importantes des nanoparticules	41
III.3 Enjeux analytiques	47
IV Méthodes de détection et de caractérisation des nanoparticules de plastique	49
1.1.1 Fractionnement en fonction de la taille des nanoplastiques	52
1.1.2 Augmentation de la Concentration en particules	53
1.1.3 Caractérisation de la taille, forme et concentration :	54
1.1.4 Caractérisation chimique	57
1.1.5 Conclusion	60
V Bibliographie	62

CHAPITRE 2 : Comportement de différentes nanoparticules de plastique dans des milieux salés	74
I Introduction	74
II Matériels et méthodes	74
II.1 Diffusion dynamique de la lumière	74
II.1 Microfluidique	78
II.2 Nanoparticules de plastiques	81
II.1 Démarche expérimentale Batch et microfluidique.....	87
III Résultats	89
III.1 Comportement de nanoplastiques dans un gradient de salinité : approche expérimentale utilisant la microfluidique	89
III.2 Résultats complémentaires.....	115
IV Conclusion	119
V Bibliographie.....	122
CHAPITRE 3 : Impact écotoxicologique de nanoparticules de plastique sur les huîtres de Guadeloupe.....	125
I Introduction	125
II Démarche expérimentale	125
II.1 Huître des palétuviers	127
II.2 Gènes d'intérêt.....	127
III Exposure of mangrove oysters to nanoplastics through a microfluidic salinity gradient reveals impacts on gene expression at environmental levels	132
IV Conclusion	152
V Bibliographie.....	153
CHAPITRE 4 : La technologie LIBD pour la détection de traces de nanoparticules	158
I Introduction	158
II Matériels et méthodes	158
II.1 Laser Induced Breakdown Detection	158
II.2 Protocole d'obtention d'une courbe en S.....	165
II.3 Préparation d'échantillon.....	166
III Résultats et discussion	166
III.1 Étude comparative des lasers du Magellan	166
III.2 Mesure de différents types de particules	177

IV Conclusion	189
V Bibliographie.....	190
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	192
Annexe I : Algorithmes de la DLS.....	198
Annexe II : Composition des milieux	201
Annexe III : Cinétiques d'agrégation en batch et dans un gradient de salinité	203
Annexe IV : Séquence des amorces.....	207
Annexe V : Exposition directe des huitres selon le protocole B.....	208
Annexe VI : Caractéristiques des laser Flare 532 et Flare NX.....	216
Annexe VII : Bases d'optique	216
I Caractéristiques d'un laser	216
I.1 Longueur d'onde	216
I.2 Puissance, durée d'impulsion et fréquence	217
I.3 Intensité.....	218
I.4 Faisceau Gaussien	218
I.5 Propagation du faisceau.....	218
I.6 Préchauffage et pointé laser	220
I.7 Dimensions de la cavité.....	220
II Outil optiques.....	220

Index des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- CCC : Concentration critique de coagulation
- CMC : Concentration micellaire critique
- DLA : *Diffusion Limited Aggregation*
- DLS : *Dynamic light scattering*, Diffusion dynamique de la lumière
- LIBD : *Laser Induced Breakdown Detection*, détection de plasmas induits par laser
- MP : microparticule
- MPt : microplastique
- MT : métallothionéine
- NP : nanoparticule
- NPG : nanoparticules issues du broyage de morceaux de plastiques récoltés sur les plages de Guadeloupe
- NPt : nanoplastique
- PDMS : polydimethylsiloxane
- PE : polyéthylène
- PEG : polyéthylène glycol
- PET : polytéréphtalate d'éthylène
- PP : polypropylène
- PS : polystyrène
- PSL : nanosphères latex de polystyrène
- PS-ref / PS-NP : nanoparticules issues du broyage de pellets de polystyrène
- PVC : polychlorure de vinyle
- RLA : *Reaction Limited Aggregation*
- RT-qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel
- SDS : sodium dodecylsulphate (surfactant)
- T-X100 : Triton-X100 (surfactant)

Valorisation des travaux de thèse

Publications scientifiques

- **Environmental fate of nanoplastics in salinity gradient zone: where does the nanoscale fraction of plastic debris accumulate?**
 - Z Venel, H Tabuteau, A Pradel, B Grassl, H El Hadri, M Baudrimont, J Gigault
 - *Environmental Science & Technology*
 - *Soumis*
- **Behavior of nanoplastics in relevant salinity gradient: experimental approach using lab-on-a-chip**
 - Z Venel, H Tabuteau, A Pradel, H El Hadri, M Baudrimont, J Gigault
 - *Nature communication*
 - *En préparation*
- **Exposure of swamp oysters to nanoplastics through a microfluidic salinity gradient reveals impacts on gene expression at environmental levels**
 - Z Venel, A Arini, H Tabuteau, J Gigault, M Baudrimont
 - *Environmental science : Nano*
 - *En preparation*
- **Impacts of dietary exposure to nanoplastics with/without arsenic in the Guadeloupean mangrove oysters (*Isognomon alatus*)**
 - M Lebordais, Z Venel, J Gigault, V S Langlois, M Baudrimont
 - *Environmental Pollution*
 - *Soumis*

Présentations en conférence internationales

- **Aggregation kinetics of plastic nanoparticles in fresh and marine phytoplankton culture media**
 - Venel Z., Gigault J., and Baudrimont M.
 - *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Rome 2018*
 - Poster
- **Representative behavior of nanoplastics in a salinity gradient: a micro-chip to go one step further?**
 - Z Venel, H Tabuteau, M Baudrimont, J Gigault
 - *SETAC, Helsinki 2019*
 - Poster + présentation orale flash

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les plastiques sont des matériaux qui ont été massivement produits à partir du milieu du XXème siècle et qui sont devenus essentiels pour les sociétés industrialisées. La demande ne cesse de croître, augmentant la production et en conséquence la quantité de déchets. Les plastiques ont une longue durée de vie et s'accumulent dans les eaux de surfaces tout en se dégradant. Peu à peu les fragments rétrécissent jusqu'à devenir des particules de taille micro voire nanométrique. Ces particules peuvent devenir vectrices d'additifs toxiques ou polluants adsorbés à leur surface. Les particules de taille nanométriques sont particulièrement problématiques car elles peuvent traverser les membranes biologiques.

Face au risque que représentent ces particules pour les écosystèmes et *in fine* pour l'Homme, il est important de pouvoir caractériser ces nanoparticules dans l'environnement et de comprendre leur comportement. Cela permettrait de déterminer leur transport, leur devenir, leur biodisponibilité et leur (éco)toxicité. Cependant c'est un véritable challenge technique d'étudier les nanoparticules de plastique car les techniques analytiques adaptées sont limitées.

Par ailleurs, la littérature disponible portant sur le comportement et la toxicité des nanoparticules de plastique se concentre essentiellement sur des nanosphères de polystyrènes et utilisant des concentrations nettement plus élevées de ce qui pourrait être dans le milieu naturel. Ces particules sont calibrées en taille et contiennent souvent des surfactants et des biocides. Or, ces particules ne sont pas représentatives des nanoparticules de plastique environnementales. D'autre part, les études utilisent des milieux de force ionique fixe, alors que l'environnement aquatique est composé d'une succession de systèmes de forces ioniques différentes et de gradients de salinité. C'est le cas par exemple des eaux de transition comme les estuaires ou les mangroves.

Cette thèse de doctorat, est une thèse CIFRE (convention ANRT) permettant la collaboration de l'entreprise Cordouan Technologie avec deux laboratoires de recherche : le laboratoire EPOC de l'université de Bordeaux, et le laboratoire géoscience de l'université de Rennes 1.

Cordouan Technologies est une entreprise fabriquant et distribuant des instruments optiques destinés à la caractérisation de nanoparticules. Ce partenariat permet à l'entreprise d'explorer les capacités analytiques de nouvelles technologies optiques pour des applications environnementales, et notamment la caractérisation de nanoparticules dans l'environnement. Cela lui permet également d'être valorisé et promu par des études scientifiques. Enfin, la doctorante peut apporter son expertise quant aux applications de la technologie LIBD pour les demandes client. En échange, l'entreprise finance une partie de la thèse, et met à la disposition des instruments de mesure de nanoparticules ainsi qu'un laboratoire d'application pour les chercheurs et la doctorante. La doctorante a ainsi travaillé 1 an auprès de chaque partenaire pour étudier des domaines différents de la thèse : étude des instruments optiques et de la LIBD chez Cordouan Technologies, caractérisation physico-chimique et étude du comportement des nanoparticules au laboratoire de Géoscience, et évaluation de l'impact écotoxicologique au laboratoire EPOC.

Cette thèse de doctorat vient s'appuyer sur un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche, le projet PEPSEA (*nanoParticlEs of Plastics in the environment: Source, prediction and impact*) coordonné par Julien Gigault. L'objectif de ce projet est de caractériser les nanoplastiques, leurs sources et leurs devenir ; mais aussi de connaître leurs impacts écotoxicologiques. Les deux principaux sites d'études sont les mangroves de la Gabarre et du Moule situés sur l'île de la Guadeloupe. La thèse s'inscrit dans le volet d'étude de la toxicité des nanoplastiques sur des animaux endémiques de Guadeloupe.

Le but de ce travail de thèse est tout d'abord (i) de comprendre le comportement de nanoparticules de plastiques représentatives de l'environnement dans un gradient de salinité tel qu'on pourrait le retrouver dans les mangroves de Guadeloupe, puis (ii) d'évaluer leurs toxicités dans ces zones particulières en utilisant des huîtres des Palétuviers *Isognomon alatus*.

Pour correspondre aux conditions environnementales des eaux de mangrove un des objectifs a été de prendre en compte la dynamique spatio-temporelle de la mangrove (gradient de salinité, température) sur le comportement des nanoplastiques et leurs impacts. Pour cela nous avons développé un système unique pour mimer le gradient de salinité en utilisant des méthodes de microfluidique (Gigault et al., 2018a).

Afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales, nous avons comparé le comportement de nanosphères de polystyrène standard (PSL) à des nanoparticules modèles : (i) des nanoparticules de polystyrènes de référence vieilles en laboratoire (PS-ref), et (ii) des nanoparticules issues de fragments de plastiques vieillis *in situ* sur les plages de Guadeloupe (NPG). Puis la toxicité de ces nanoparticules a été évaluée sur des huîtres des palétuviers en utilisant les méthodes de microfluidique.

Le premier chapitre sera un état de l'art sur les micro et nanoparticules de plastiques. Il débutera par le contexte de la pollution de l'environnement par les déchets plastiques, avec un accent sur le cas des mangroves et la dégradation des débris en micro et nanoplastiques. Ensuite la toxicité des micro et nanoparticules de plastique sera présentée. Puis nous aborderons les limites analytiques pour la détection et la caractérisation des nanoplastiques. Nous expliquerons par la suite quelles sont les problématiques soulevées par la littérature scientifique quant aux choix et à la représentativité des nanoplastiques utilisées dans les études écotoxicologiques ainsi que de leur mode de dispersion. Enfin, les propriétés et les caractéristiques des nanoparticules en général, seront abordées, ainsi que les enjeux analytiques et les principales techniques pour détecter et caractériser les plastiques de taille nanométrique.

Le sujet du deuxième chapitre sera la caractérisation du comportement de nanoparticules de plastique dans des milieux salés. Un article comparera les résultats obtenus par des protocoles de dispersion classique avec une méthode utilisant la microfluidique pour créer un gradient de salinité. Le comportement de nanosphères de polystyrène latex sera comparé à celui de nanoparticules de plastiques représentatives de l'environnement.

Le troisième chapitre traite de l'impact écotoxicologique des différentes nanoparticules étudiées dans le chapitre deux. Un article exposera les résultats obtenus sur les huîtres de mangroves exposées aux nanoparticules de plastique par voie directe dispersées en utilisant la microfluidique. La production de métallothionéines ainsi que l'expression précoce des gènes ont été étudiés pour évaluer leurs toxicités.

Le dernier chapitre de la thèse portera sur le développement de la technologie de détection de plasma induite par laser (*laser induced breakdown detection*, LIBD). Une première partie présentera l'historique de création de l'instrument, ainsi que son principe de fonctionnement. La deuxième partie sera consacrée à l'étude du nouveau laser inclus dans l'instrument ainsi qu'à l'analyse de plusieurs types de nanoparticules dans différents milieux.

Enfin, une conclusion générale relatant les principaux résultats obtenus, ainsi que les perspectives soulevées par l'ensemble de ce travail sera présentée.

CHAPITRE 1 : État de l'art

I Le problème des déchets plastiques

I.1 La pollution par les plastiques

Les plastiques pétrosourcés sont des polymères organiques synthétiques obtenus par polymérisation de monomères qui sont extraits d'huile ou de gaz auxquels sont ajoutés des additifs pour leur donner des propriétés particulières (colorant, résistance aux irradiations solaires, résistance aux attaques bactériennes et fongiques, flexibilité). Les matériaux plastiques sont légers, durables, inertes et résistants à la corrosion (Guzman et al., 2006b). La Figure 1 illustre les principales données sur la production et les déchets liés à l'industrie plastique en fonction des années. Du fait de leurs atouts, la production annuelle de plastiques ne cesse d'augmenter depuis les années 50 (Figure 1A), passant de 1,5 million de tonnes à 348 millions de tonnes en 2017 (PlasticsEurope, 2018).

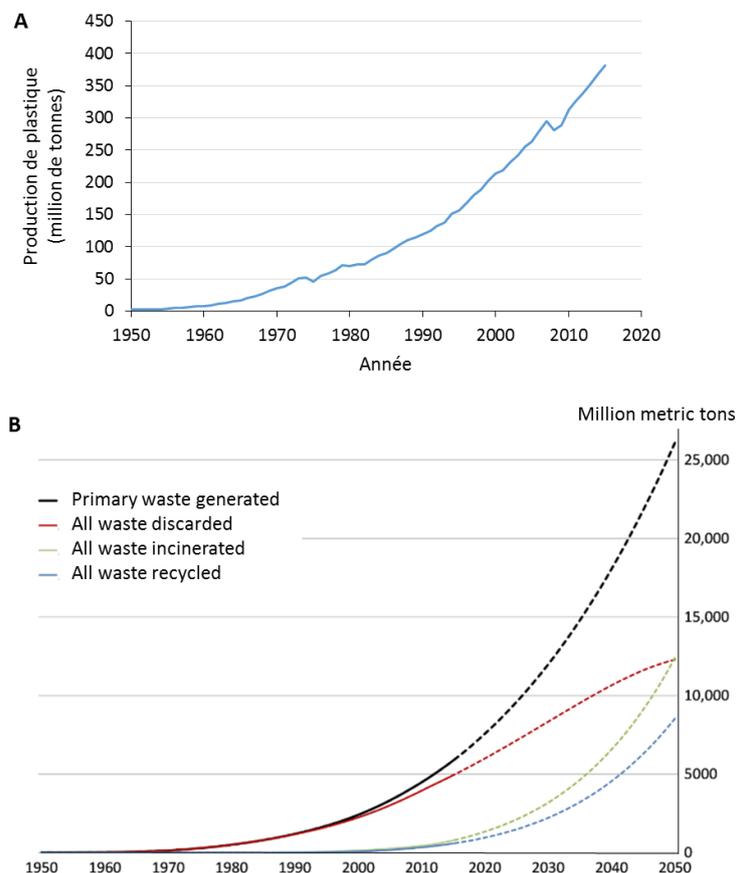


Figure 1 : A) Production annuelle globale de résines de polymères et de fibre 1950 à 2015. B) Représentation cumulative de la production de l'incinération et du recyclage de déchets plastiques en millions de tonnes métrique. Les lignes pleines indiquent les données historiques de 1950 à 2015. Les lignes pointillées sont les projections des tendances jusqu'à 2050. (Geyer et al., 2017).

En raison de leur faible biodégradabilité et de leurs propriétés de résistance variées en fonction de leur composition, les plastiques ont une durée de vie dans l'environnement estimée à des

centaines voire des milliers d'années (Barnes et al., 2009). Même si les nouvelles directives interdisent de plus en plus ces pratiques, ils sont beaucoup utilisés pour les produits à usage unique. De ce fait, la quantité de déchets plastique augmente avec les années et les modèles estiment qu'elle dépassera les 25 000 tonnes en 2050 (Figure 1B). Même si le recyclage des déchets commence à être intéressant et appliqué en Europe, en Chine et aux États Unis, il ne représente que 18% de la totalité des déchets plastiques produits en 2010. Le reste des déchets étant incinérés (24%) ou dans leur grande majorité : mis en décharge (Figure 1B) (Geyer et al., 2017).

En raison des processus géochimiques naturels, les sols et les systèmes aquatiques sont les compartiments les plus exposés car ils sont la destination finale de tous contaminants (rejets directs, lessivage, dépôts atmosphériques...) (Nowack and Bucheli, 2007). Ces plastiques transitent à travers les différents compartiments environnementaux pour s'accumuler *in fine* dans les océans (Figure 2A) (Barnes et al., 2009; Cole et al., 2011). Il est estimé que la quantité de plastiques accumulés dans les océans atteindra 250 millions de tonnes en 2025 (Jambeck et al., 2015). Avec les courants océaniques, les déchets se concentrent dans les grands gyres océaniques et principalement dans ceux de l'Atlantique Nord et du Pacifique Nord (Figure 2A et B) (Law et al., 2010). Dans ce dernier, l'accumulation de déchets est telle, qu'elle a été nommée "7ème continent" ou "grand vortex de déchets du Pacifique Nord" (NOAA, n.d.). C'est une zone comportant une concentration anormale de déchets plastiques très fins flottant dans les 30 premiers mètres de la colonne d'eau, sur une surface estimée entre 1,5 et 3,5 millions de km², avec une densité moyenne évaluée à 5 kg de plastiques par km² (Thompson, 2015).

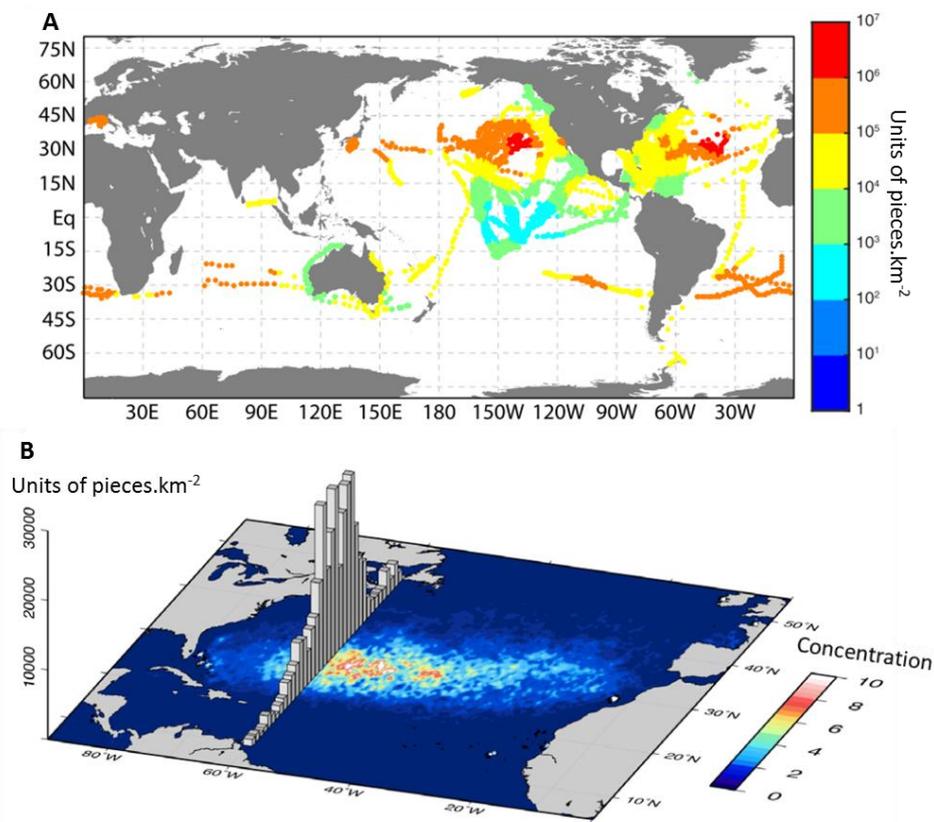


Figure 2 : A. Localisation des microplastiques (nombre) dans les océans (van sebillle 2015). B. concentration de déchets plastiques dans le Gyre Atlantique Nord (concentration en gradient de

couleur obtenu à partir de la modélisation d'un traceur de surface initialement homogène (C=1) sur 10 ans) (Law et al., 2010).

Parmi les polymères les plus retrouvés dans l'environnement marin, les polyéthylènes (PE) haute et basse densité (HDPE, LDPE), le polychlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS), le polypropylène (PP) et le polytéréphtalate d'éthylène (PET) sont les majoritaires (Andrady, 2011). La formule chimique de ces polymères est indiquée en Figure 3.

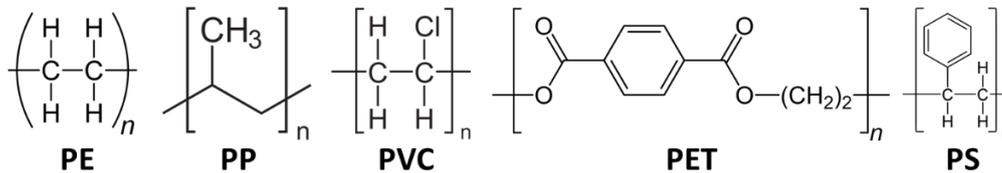


Figure 3 : formule chimique des principaux polymères retrouvés dans l'environnement.

I.1.1 Les mangroves et la pollution plastique

Entraînés par les courants océaniques, les déchets plastiques échouent sur les côtes (Thiel et al., 2013) et les plages (Browne et al., 2011; Lavers and Bond, 2017). Parmi les différentes interfaces Terre-Mer, les mangroves sont des écosystèmes tropicaux particuliers et fortement soumis aux pressions anthropiques qui sont également impactés par la pollution des plastiques. Elles se situent dans des zones de transition entre l'eau douce provenant du continent et l'eau salée de l'océan. La faune et la flore qui les composent ont développé des adaptations aux variations de niveau d'eau et aux variations de salinité. La température varie peu et monte souvent au-delà de 25°C.

Les racines partiellement émergées des palétuviers situés sur la frange intertidale atténuent la puissance des vagues et les turbulences (Martin et al., 2019). Comme les courants sont faibles il y a une stratification des eaux. L'eau salée marine, dense, stagne au fond des mangroves ; tandis que l'eau douce provenant des rivières ou du lessivage des eaux de pluie circule en surface. Cette stratification limite l'apport d'oxygène dans la couche d'eau salée provoquant souvent des zones d'hypoxie voire d'anoxie surtout pendant les périodes sans vent, ou avec un faible afflux marin. Les mangroves étroites et profondes sont plus susceptibles de subir cette stratification. En revanche, les mangroves larges et peu profondes seront plus enclines à avoir des gradients de salinité le long de la colonne d'eau. Le faible taux d'oxygène dans les sédiments est accentué par un apport terrigène via les rivières, en matière organique et matières en suspension qui se traduit par une sédimentation importante dans ces eaux (Mohammed et al., 2014). Pour pallier à ce manque d'oxygène, les palétuviers ont un système racinaire aérien et des pneumatophores (Figure 4).



Figure 4 : Palétuviers rouges dans une mangrove de Guadeloupe (Office Nationale des Forêts)

Les objets transportés par le courant, comme les déchets plastiques flottants, peuvent être piégés par ces racines en échasse (Martin et al., 2019), d'autant plus que l'hydrodynamique y est faible et que ces zones sont souvent utilisées par l'Homme comme décharges. En conséquence, les macro et microplastiques peuvent facilement s'y accumuler (Barasarathi et al., 2011; Lima et al., 2014; Lourenço et al., 2017; Mohamed Nor and Obbard, 2014; Naji et al., 2017). Mais les mangroves n'ont pas toutes les mêmes capacités de rétention, et certaines peuvent aussi relarguer ces déchets (en fonction des caractéristiques hydrodynamiques) (Ivar do Sul et al., 2014). Les études de la pollution plastique des mangroves montrent que les déchets peuvent venir de la forêt, du lessivage des terres environnantes, des rivières (Cordeiro and Costa, 2010) et de l'océan (Martin et al., 2019).

Aujourd'hui, le rôle des palétuviers comme piège pour les plastiques marins est encore peu exploré alors que les mangroves sont des écosystèmes importants. En effet ils sont des puits de carbone conséquents (Almahasheer et al., 2017; Mcleod et al., 2011) ainsi que des refuges et des habitats pour la vie marine (Duarte et al., 2013; Spalding et al., 2010). Les mangroves sont des écosystèmes humides de petite superficie et très fragiles. L'urbanisation, le remblaiement, le tourisme, la pollution due à la démographie côtière, et la montée des eaux dû au changement climatique peuvent contribuer à la disparition des mangroves. Leur superficie mondiale est passée de 18,8 millions d'hectares en 1980 à 15,2 millions en 2005, soit une perte de 3,6 millions d'hectares (FAO, 2007).

Compte tenu de la position du Gyre Atlantique Nord, les récentes études faites dans le cadre du projet ANR-PEPSEA (coordonné par Julien Gigault) ont montré la forte exposition des îles Caraïbéennes aux déchets plastiques accumulés dans cette partie de l'océan. En plus de cette pression océanique ces îles subissent une pression anthropique forte à cause du tourisme et une activité industrielle importante notamment avec la présence des raffineries de pétrole et d'industries chimiques. Les eaux usées sont rarement traitées par des stations d'épurations. La

pollution métallique (Cd, Hg et Pb) ainsi que la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et de polluants organiques persistants (Dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT), Poly-chlorobiphényles (PCB), poly-bromo-diphényléthers (PBDE)) est préoccupante dans cette région. Les mangroves sont en effet capables de séquestrer, les éléments traces métalliques ainsi que les polluants organiques via leur absorption sur les particules en suspension qui finissent par être enfouis dans les sédiments. L'équipe d'Aguirre montre une concentration élevée en métaux (Hg, As, Cd, Pb), HAP, DDT et PCB dans les tissus d'huîtres *Crassostrea rhizophorae* des mangroves des côtes caribéennes (Aguirre-Rubí et al., 2018).

Nous nous intéresserons particulièrement au cas de la Guadeloupe dans les Antilles françaises qui est un des *hot spot* mondiaux de biodiversité des Caraïbes et représente une priorité pour la conservation ((Brooks et al., 2006; Mittermeier et al., 2011; Shi et al., 2005). L'île possède deux mangroves intéressantes subissant des pollutions de source différentes (Figure 5).

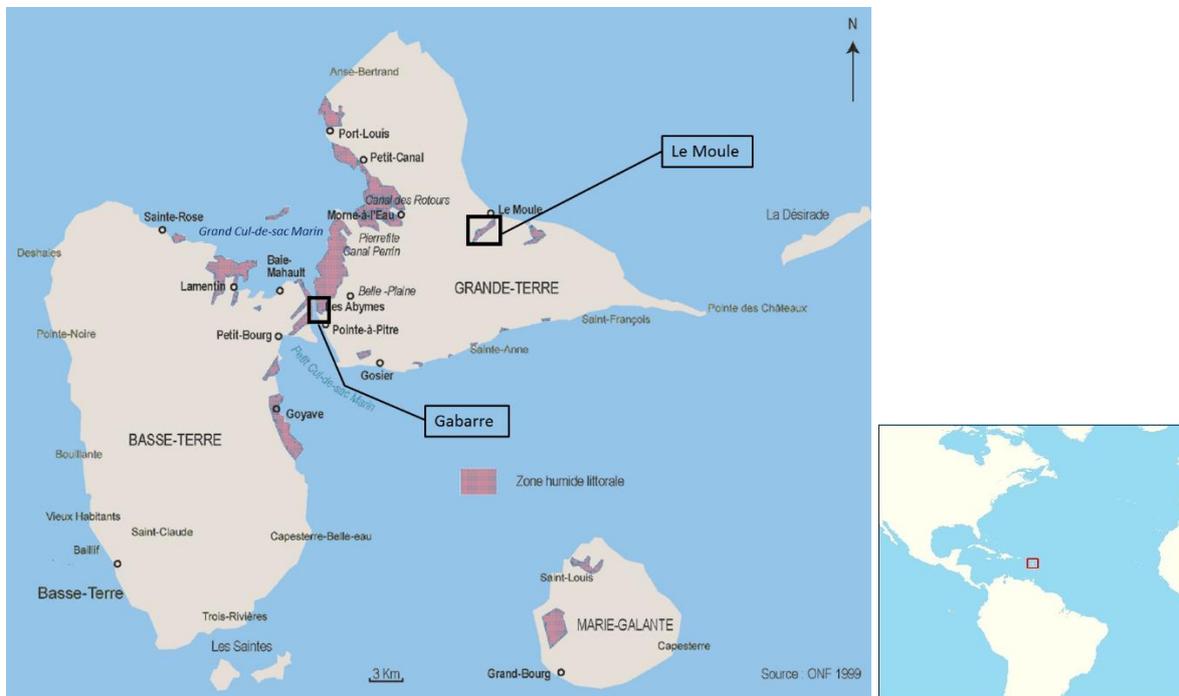


Figure 5 : Carte de la Guadeloupe dans les Antilles françaises. Les zones humides sont indiquées en rose. Les mangroves de la Gabarre et du Moule sont indiquées par des rectangles.

La mangrove du site de la Gabarre se trouve au niveau du lagon du Grand Cul-de-sac marin, proche d'une zone urbanisée et principalement soumise au lessivage d'une décharge. La Mangrove du Moule est exposée au courant du Gyre Atlantique Nord et ses déchets plastiques ainsi qu'à une forte pression anthropique urbaine.

1.2 Problèmes sociétaux et économiques causés par les déchets plastiques

Les gros déchets plastiques aussi appelés « macro-plastiques » posent des problèmes de pollution visuelle impactant le tourisme, perturbent les industries de la pêche et de production d'énergie ainsi que l'aquaculture. Mais ces déchets sont aussi nuisibles aux animaux marins qui peuvent mourir en les ingérant (poissons, oiseaux, reptiles et mammifères marins). Les macro-plastiques peuvent être colonisés par des microorganismes qui forment des biofilms, puis des

tapis d'algues qui attirent des invertébrés. Ils peuvent aussi servir de support pour le transport d'espèce comme les bryozoaires ou les cnidaires (Cole et al., 2011). Cette colonisation et ce transport sur de longues distances peuvent être problématiques dans le cas d'espèces nuisibles et envahissantes. Cependant certaines matières plastiques (PE, PP, PVC, polycarbonates) peuvent être biodégradés par certains de ces microorganismes (Eriksen et al., 2019).

1.3 Microplastiques et nanoplastiques

Dans les eaux de surface on retrouve des macro-déchets mais aussi des fragments de plastique plus petits appelés « micro-plastiques », allant de 10 mm à 1 µm. Il en existe deux types classés selon leurs origines.

Microplastiques primaires

Les microplastiques primaires sont des plastiques manufacturés pour avoir une taille microscopique (5 mm à 1 µm). Ces microparticules (MP) sont principalement utilisées en cosmétique dans les soins gommant, dentifrices ou maquillage (Auta et al., 2017). Mais aussi dans les vêtements synthétiques, dans les procédés de sablage à air comprimé, ou comme vecteurs de médicaments en médecine. On peut également inclure la production de granulés de plastique (2-5 mm de diamètre) servant de matière première pour la fabrication de produits en plastique (Cole et al., 2011). Les microplastiques primaires se retrouvent dans l'environnement de manière non intentionnelle. Ça peut être via le lessivage des déchetteries à ciel ouvert, à cause de déversement accidentels, lors des transports de matériaux (granulés de polystyrène). Ces MP peuvent aussi arriver dans les rivières par les eaux usées (microbilles de cosmétiques, fibres de vêtements dans les machines à laver) car les stations d'épurations ne sont pas équipées pour les retenir (Alimi et al., 2018; Cole et al., 2011).

Il existe également des plastiques synthétisés pour avoir une taille nanométrique. Ils sont utilisés dans plusieurs produits comme les peintures à base d'eau, les adhésifs, les revêtements, les produits biomédicaux, l'administration de médicament (nanosphères, nanocapsules), le diagnostic médical, l'électronique, et l'optoélectronique. Les nanosphères de polystyrène latex, appelées PSL, sont calibrées en tailles et sont utilisées dans la recherche notamment pour la calibration et l'étalonnage des instruments (Albert A Koelmans et al., 2015).

Microplastiques secondaires

Les microplastiques secondaires (MPt) apparaissent à partir des macro-déchets qui sont altérés par des procédés physiques, chimiques et biologiques dans l'environnement, que ce soit sur les sols ou dans les eaux de surface. L'exposition à la lumière du soleil et en particulier les UVs, entraîne une photo-dégradation du plastique se traduisant par une oxydation de sa surface (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009). Ce processus est amplifié par le froid et les conditions halines de l'environnement marin. Les débris plastiques présents sur les plages vont jaunir, s'oxyder, devenir cassants et se fissurer (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009). Ils seront alors susceptibles de se fragmenter sous les effets de l'abrasion, des vagues et des turbulences (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009; Wagner et al., 2014). Le schéma en Figure 6 montre comment la surface de microparticule se fissure puis se fragmente. Ces microplastiques sont principalement des composé mixtes de polyéthylène-polypropylène (70%), suivis par les polyéthylènes (18 %), le polypropylènes (11%,) et polystyrène (1%) (Ter Halle et al., 2016).

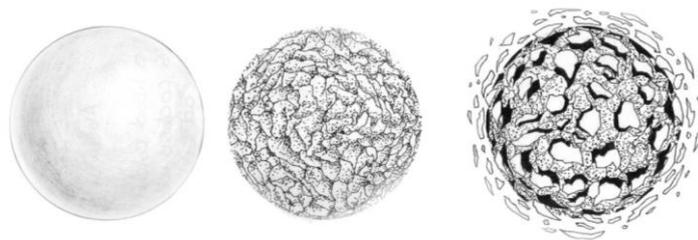


Figure 6 : Schéma des processus de fragmentation d'un micro-plastique sphérique. Initialement la particule est lisse, puis elle se fissure en surface, et enfin la couche superficielle est partiellement fragmentée (Andrady, 2017).

Cependant, tous les modèles estimant la densité de microplastiques dans les gyres océaniques à partir des campagnes de prélèvements, tendent à montrer que seulement 1% de la quantité attendue est observable (Cozar et al., 2014). Pour expliquer ce grand écart, il faut reconsidérer le mode de prélèvement. En effet, un filet à plancton réglementaire présente une dimension de maille de 330 μm voire 50 μm pour certaines expéditions (Mattsson et al., 2015). C'est d'ailleurs pour cette raison que les microplastiques sont souvent définis par des dimensions comprises entre 50 μm et 5 mm. D'où l'hypothèse principale qu'une grande partie de la masse de plastique manquante serait en réalité présente sous la forme de particules sub-microniques qui n'ont pas encore été étudiées, faute d'outils de prélèvement et de détection adéquates.

Plusieurs études montrent que les fragments peuvent atteindre des tailles très petites de l'ordre du nanomètre (Gigault et al., 2016; Lambert and Wagner, 2016a, 2016b). Ces particules s'accumulent dans les océans tout comme les macro et microplastiques, en particulier dans le Gyre Atlantique Nord (Gigault et al., 2018c; ter Halle et al., 2017). Ces plastiques secondaires de taille inférieure à 1 μm sont appelés « nanoplastiques » (NPt) selon la définition de Gigault et al. (2018). Dans cette étude nous considèrerons que le terme « nanoparticule de plastique » désignera les plastiques de taille nanométrique dans leur ensemble, qu'elles soient primaires (PSL) ou secondaires (nanoplastiques issus de la dégradation des déchets plastiques). Nous utilisons l'acronyme NP ou MP pour désigner des nanoparticules ou des microparticules respectivement.

1.4 Toxicité des microplastiques

Les microplastiques secondaires (MPt) peuvent être dangereux pour les organismes marins de par leur forme et leur taille, mais aussi par leurs propriétés chimiques. La plupart des études portent sur des microparticules (MP) de plastiques sphériques synthétisées en laboratoire, mais permettent d'avoir un aperçu des effets toxiques potentiels.

Les microparticules de plastique peuvent s'attacher sur les êtres vivants et empêcher les échanges gazeux quand ils sont en surface de certains organes tels que les branchies. C'est ce qui a été démontré par Watts et al. (2014) en exposant des crabes pendant 21 jours à des microsphères de 10 μm (4.10^4 - 9.10^5 part/l). Ils peuvent aussi perturber les mouvements des organismes comme c'est le cas de microsphères de 1 à 5 μm qui s'agglomèrent en surface de larves D d'huîtres, et qui gênent le mouvement de leurs cils locomoteurs. Ces MP causent également de sévères malformations et des arrêts du développement après une exposition de 24h (1-10 mg MP L⁻¹) (Bringer et al., 2020a).

Le plus souvent les MPt sont ingérés par erreur, et peuvent contaminer tous les niveaux trophiques. Ainsi les consommateurs primaires tels que les moules et des huîtres destinées à la consommation humaine peuvent contenir des MPt (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Dans le cas de consommateurs secondaires, des MPt ont été retrouvés dans les contenus stomacaux de poissons démersaux et pélagiques (Lusher et al., 2013), de langoustines (Murray and Cowie, 2011), de crevettes grises (Devriese et al., 2015), d'oiseaux marins (Brandão et al., 2011; Eriksson and Burton, 2003) et de mammifères marins (Brandão et al., 2011) prélevés dans l'environnement. Cette ingestion a également été montrée en laboratoire sur divers bivalves et des crustacés avec des microbilles de 10 μm (5-250 particules mL^{-1}) (Setälä et al., 2016) ou sur le zooplancton avec des microsphères de 7 ; 20 et 30 μm (Cole et al., 2013).

Cette ingestion peut entraîner une occlusion du tractus digestif (Cole et al., 2013), des inflammations (Von Moos et al., 2012), un stress hépatique, une diminution de la croissance (Paul-Pont et al., 2018; Wright et al., 2013).

L'ingestion de microbilles de polystyrène de 2 et 6 μm (10-23 $\mu\text{g L}^{-1}$) chez l'huître pendant les 2 mois de la période de reproduction, a causé une augmentation de l'absorption de micro algues, certainement pour compenser l'absorption de MP qui a diminué l'apport énergétique. Il y a également eu une diminution de la quantité d'oocytes produits (38%), une diminution de la rapidité des spermatozoïdes et une diminution du rendement larvaire (41%). Les larves de la génération F1 ont vu une baisse de leur développement (18%). Du fait d'une diminution des apports alimentaires, l'énergie dédiée à la reproduction a été détournée pour être investie dans la croissance structurelle ce qui a augmenté les coûts énergétique pour la survie des huîtres contaminées (Sussarellu et al., 2016).

Il a été montré que des microsphères de polystyrène de 7 μm (4000 à 25 000 part/ ml) ou de 20 μm (75 part/ml) peuvent instaurer une illusion de satiété qui diminue le taux d'alimentation du zooplancton (copépodes) (Cole et al., 2015, 2013). En conséquence il y a une diminution du taux de reproduction (Cole et al., 2015; Lee et al., 2013) et de la fécondité (Lee et al., 2013) ce qui pourrait impacter la survie de la population.

Des microfibrilles de plastiques en PET de 300 μm induisent une mortalité de 20 à 40% des daphnies après 48h si elles n'ont pas été nourries avant l'exposition, alors qu'il n'y a aucun effet sur ces mêmes organismes nourris au préalable (Jemec et al., 2016).

Quelques études récentes montrent les effets de MPt. Il a été montré que l'ingestion de pellets de polyéthylène neufs (3 mm) ou de polyéthylène vieillis *in situ* (<500 μm) inclus dans la nourriture (10% massique) peuvent altérer l'expression des gènes de médaka japonais. Il y a eu une diminution de l'expression de la choriogénine chez les mâles, et une diminution de l'expression de la vitellogénine et du récepteur aux œstrogènes chez les femelles (Rochman et al., 2014b). Il y a également eu des études à partir de Micro-fragments récoltés dans l'environnement. Des MPt issus des plages de Hawaii (16-900 μm) assimilés par l'alimentation (0.1-1% massique) peuvent causer une augmentation de la mortalité, une diminution de la croissance, une augmentation d'espèces réactives de l'oxygène, des cassures d'ADN et une altération du comportement de nage des larves de Médaka (Pannetier et al., 2020)

La taille est également un facteur important dans l'ingestion des microplastiques. Les huîtres ingèrent préférentiellement des microbilles de 6 μm (118 particule mL^{-1}) par rapport à celles de 2 μm (2062 particule mL^{-1}), ce qui est expliqué par la taille optimum des micro algues retenue

par le filtre branchial (Sussarellu et al., 2016). Un phénomène également observé par Cole et al. avec différentes espèces de zooplancton qui préfèrent les microsphères de 7 μm par rapport à celles de 20 et 30 μm (Cole et al., 2013). Les effets des MP de plastique peuvent également varier selon la taille. Ainsi des microsphères de HDPE de 5 et 10 μm induisent un taux plus important de malformations et d'arrêt du développement que des microsphères de 20-25 μm chez les larves D d'huîtres du pacifique). Les petites microsphères ont également causé un ralentissement de la nage et des comportements de nages anormaux. (exposition sur 24h aux concentrations de 0.1-10 mgMP L⁻¹ (Bringer et al., 2020b)

Les microbilles de plastique ont tendance à s'accumuler dans le tractus digestif de bivalves comme le montrent Brillant et Macdonald (2000). L'absence de particules dans les cellules épithéliales de l'intestin, montrent qu'elles n'ont pas pu être phagocytées, sûrement à cause de leur taille importante (20 μm). En effet la taille des particules pouvant être phagocytée est limitée à 10 μm (Kou et al., 2013). La translocation des microparticules depuis le système digestif vers le système circulatoire est néanmoins possible, comme le montrent Browne et al, chez la moule *Mytilus edulis* avec des billes de 2 et 4 μm (Browne et al., 2008).

Les MPt peuvent être associées à de la matière organique comme à des agrégats de phytoplancton (Lagarde et al., 2016; Long et al., 2015) ou lorsqu'ils sont excrétés dans les pelotes fécales après avoir été ingérés par le zooplancton (Cole et al., 2016). Lorsqu'ils sont associés à de la neige marine, leur biodisponibilité peut être augmentée. La neige marine est un mélange de particules organiques amorphes qui sédimentent le long de la colonne d'eau. Elles peuvent être composées d'organismes morts ou de leurs restes, de pelotes fécales, de détritiques et autres particules naturelles complexées avec des molécules de haut poids moléculaire. Ainsi, Porter et al. montrent que la biodisponibilité de MP de divers polymères (fibres de 50 à 3000 μm , billes de 7 à 30 μm , fragments de 115 à 156 μm) est augmentée lorsqu'ils sont associés à de la neige marine artificielle (Porter et al., 2018).

Plusieurs études montrent qu'il peut y avoir un transfert trophique des MPt en examinant les contenus stomacaux de poissons de la Manche (Lusher et al., 2013) ou celui de langoustines communes dans la mer de Clyde (Murray and Cowie, 2011). Le transfert trophique a également été démontré en laboratoire avec des billes de polystyrènes de 10 μm , depuis les copépodes aux crevettes (1000-10000 particule mL⁻¹) (Setälä et al., 2014), ou depuis les moules vers les crabes (10⁶ particule L⁻¹) (Watts et al., 2014).

1.5 Toxicité des nanoparticules de plastique

Comme tous les nanomatériaux, les plastiques de taille nanométrique sont dangereux de par leur taille, car ils peuvent passer les barrières biologiques. Étant donné qu'à ce jour il n'est pas encore possible de caractériser et d'échantillonner une quantité suffisante de nanoplastiques dans l'environnement, les études (éco)toxicologiques portent en grande majorité sur la toxicité de nanosphères de plastique (PSL) synthétisées à l'échelle du nanomètre et disponibles dans le commerce. Ces PSL ont l'avantage d'être calibrées en taille, en sphéricité et en fonction de surface.

Action par étouffement

Ces nanoparticules peuvent agir en surface des organismes comme le montrent Bhattacharya et ses collaborateurs (2010). Des agglomérats de PSL de 20 nm (1,8-6,5 mg L⁻¹; taille des agrégats

non communiqués) présents dans le milieu de culture du phytoplancton, ont empêché la photosynthèse par la réduction de la lumière disponible ou obstruction des échanges gazeux. Ils ont également induit une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui dénote un stress oxydant (Bhattacharya et al., 2010).

Chez les larves d'artémies, une exposition de 48h aux PSL-NH₂ de 40 nm (5-100 mg mL⁻¹) ont induit une augmentation des mues. Un mécanisme qui pourrait permettre d'excréter les particules cationiques. Mais cette action a un coût énergétique certain qui pourrait impacter le métabolisme, la croissance et la reproduction des copépodes. Les PSL-NH₂ se sont également adsorbés sur les antennules sensorielles des larves, ce qui a perturbé leur nage et pourrait probablement diminuer leurs aptitudes à se nourrir car elles ne pourraient plus créer un courant approprié pour se nourrir en nageant (Bergami et al., 2016).

Assimilation par filtration et ingestion

Les bivalves assimilent ou ingèrent les nanoparticules (NP) de plastique via les branchies. En effet Ward et Kach montrent que chez la moule *Mytilus edulis* et l'huître *Crassostrea virginica*, la capture et l'ingestion sont les principales voies d'exposition aux NP pour ces bivalves (Ward and Kach, 2009). L'équipe de Wegner montre que la moule assimile des PSL-SO₄²⁻ (sans biocide) de 30 nm (0,1-0,3 g L⁻¹) sous forme d'agrégats de 1 µm, par ingestion au travers des branchies. Par ailleurs l'animal a modulé son activité de filtration en fonction de la présence de NP. En effet, dès que les particules ont été injectées dans le milieu, la moule a fermé ses valves de filtration et ne les a rouvert qu'après 20 min à seulement ¼ de leur ouverture normale. Cela dénote que les moules sont capables de détecter les PSL et de diminuer leur activité de filtration en conséquence. Chez la St jacques, des PSL de 24 et 250nm injecté dans le milieu en même temps que des microalgues peuvent être ingérées et s'accumuler dans les intestins (15 µg L⁻¹) (Al-Sid-Cheikh et al., 2018). La biodisponibilité des PSL a également été démontrée chez les larves d'artémies. Des PSL-COOH et PSL-NH₂ de 40 nm et 50 nm sont séquestrées dans la lumière de l'estomac, mais pas totalement excrétées (5-100 mg mL⁻¹; exposition de 48h) (Bergami et al., 2016).

Passage au travers des membranes cellulaires

L'équipe de Brown suggère que l'inflammation causée par des PSL dépend de leur taille, car ils observent que la concentration en cellules immunitaires (polymorpho-nucléocytes) est linéairement proportionnelle au ratio surface/volume de PSL de 64; 200 et 530 nm (125-1000 ng L⁻¹) quand elles sont injectées dans des poumons de rats (Brown et al., 2001). En 2005, Geiser et al. démontrent *in vitro*, que les nanoparticules de plastique (PSL de 80 et 200 nm) sont susceptibles de passer les barrières biologiques de cellules de macrophages ou de cellules sanguines de rats par diffusion ou par des interactions adhésives (Geiser et al., 2005). Chez le rat comme chez l'Homme, des NP (30-50 nm) peuvent traverser les membranes des intestins via les cellules M pour rejoindre le sang et le système lymphatique. Ensuite elles sont amenées jusqu'au foie et circulent de nouveau dans la bile jusqu'au petit intestin pour être finalement excrétées avec les matières fécales (Figure 7) (Galloway, 2015). Des PSL aminés (PSL-NH₂) de 50 nm peuvent même s'accumuler dans les lysosomes des cellules (cerveau) causant des dommages aux mitochondries et provoquant la mort des cellules par apoptose (Wang et al., 2013). L'équipe de Salvati a étudié le transfert membranaire de nano-polystyrènes carboxylés

et fluorescents (40-50 nm) sur des cultures cellulaires de poumon humain. Ils ont découvert que les nanoplastiques entraînent dans les cellules par endocytose, de façon irréversible (Salvati et al., 2011). En 2014, l'équipe de Rossi a montré, grâce à des simulations moléculaires, que des particules de polystyrène de 7 nm peuvent facilement passer les membranes lipidiques et perturber les fonctions cellulaires (Rossi et al., 2014). Chez les Coquilles St Jacques des PSL de 250 nm s'accumulent dans les intestins 24h après ingestion, alors que les PSL de 24 nm sont distribués dans tous les tissus (Concentration $<15\mu\text{g L}^{-1}$) (Al-Sid-Cheikh et al., 2018).

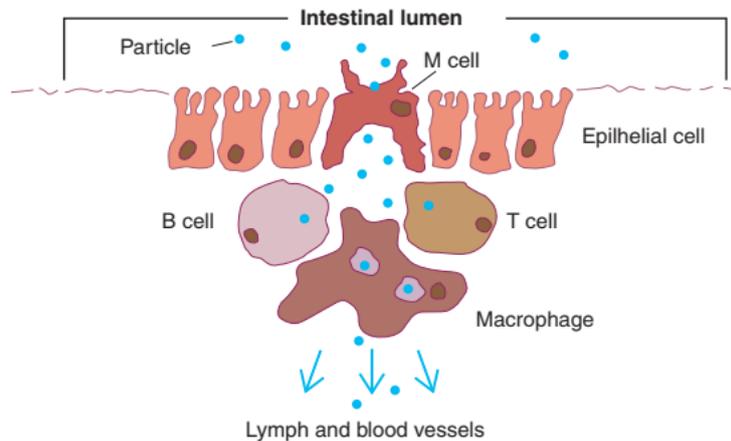


Figure 7 : Diagramme illustrant la translocation des nanoplastiques (en bleu) depuis l'intestin jusqu'au système lymphatique au travers des cellules épithéliales (chez l'humain) (Galloway, 2015)

La toxicité des nanosphères de plastique a également été démontrée chez le poisson. Kashiwada et ses collaborateurs constatent que les PSL de 39 ; 474 et 932 nm passent les membranes chez le Medaka Japonais *Oryzias latipes* et s'accumulent dans les réserves vitellines des œufs. Chez les adultes, les particules s'accumulent principalement dans les branchies et les intestins, mais aussi le cerveau, les organes génitaux, le foie et le sang. Il a donc été suggéré que les nanoplastiques étaient capables de passer la barrière hémato-encéphalique et hémato-testiculaire (Kashiwada, 2006). Chez les poissons, la pénétration par endocytose des nanoparticules de plastique serait possible au niveau de l'intestin selon l'étude mécanistique de l'équipe de Handy. Elles pourraient aussi passer entre les cellules pour rejoindre le sang par diffusion intercellulaire. En revanche, ce mode de pénétration est peu probable au niveau de l'épiderme car les cellules des poissons sont très rapprochées. Dans les branchies, il est probable que les nanoparticules (NP) s'agrègent à cause de la forte concentration en ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , ou qu'elles soient piégées dans le mucus, ce qui pourrait réduire leur assimilation par cette voie (Handy et al., 2008).

Effets physiologiques

Chez le zooplancton Besseling et al. (2014) montrent que des daphnies exposées pendant 21 jours à des PSL-COOH de 70 nm ($0,22-103\text{ mg L}^{-1}$) ont vu une réduction de leur taille et une altération de leur reproduction. De plus, alors que le nombre de naissances était inférieur à la normale, le taux de larve malformées était de 68 % (Besseling et al., 2014).

Chez les mollusques, quelques études montrent une toxicité chez les moules et les huîtres. Chez la moule, Canesi et al. (2015) étudient l'impact de PSL-NH₂ de 50 nm ($1-50\text{ }\mu\text{g/ml}$) sur les hémocytes. Ils montrent qu'après une exposition de 30 min, il y a une diminution de l'activité

de phagocytose (8-48%), une augmentation de l'activité du lysozyme (25-50%), une augmentation de la sécrétion de ROS (2 à 3 fois plus que le contrôle) et l'induction de l'apoptose des hémocytes (Canesi et al., 2015). Chez les huîtres, des PSL de 50 nm (1-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) avec différentes fonctions de surface (non fonctionnalisés, carboxylés, aminés) diminuent le succès de fécondation (de 2,7 à 93 %) et le développement des embryons avec l'apparition de nombreuses malformations, voir même un arrêt du développement (Tallec et al., 2018).

Plusieurs études sur les larves de poisson zèbre montrent un effet toxique de PSL de 25 à 50 nm (1-100 mg L^{-1} ; pendant 72h). Il est observé une baisse de la locomotion, une réduction de la taille des larves, une diminution du taux de glucose. Il peut également y avoir une augmentation de la sécrétion de cortisol ($\approx 40\%$), ayant pour conséquence des périodes d'hyperactivité (Brun et al., 2019; Chen et al., 2017) ou au contraire une diminution du rythme cardiaque (entre 5 et 10%) et une diminution de l'activité de nage quand les embryons sont exposés à des PSL de 50 nm (0,1-10 ppm) pendant 114 h (Pitt et al., 2018a).

Besseling et son équipe ont étudié les effets de PSL de 70 nm sur la daphnie, avec et sans présence de kairomone de Perche (*Perca fluviatilis*). Ces kairomones sont des substances émises par la perche qui permettent à ses prédateurs de la repérer. Les daphnies sont capables de les détecter, ce qui peut impacter leur taux de reproduction et la taille des juvéniles. Les résultats de l'étude ont montré que l'effet des kairomones était plus prononcé en présence de PSL (1,8 mg L^{-1}), ce qui suggère que les PSL ou les nanoplastiques pourraient interférer dans la communication chimique entre espèces (Besseling et al., 2014). En conséquence il pourrait y avoir une grave perturbation des comportements sexuels et alimentaires, ou l'évitement de prédateurs.

L'impact des PSL sur la reproduction et la survie de la descendance a également été mis en évidence chez les copépodes et les poissons. Lee et son équipe (2013) ont réalisé un test chronique (14 jours) sur deux générations de copépodes *Tigriopus japonicus*. L'exposition de la génération F0 à des PSL de 50 nm (0,125 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pendant 14 jours) ont rendu la génération F1 plus sensible car les PSL ont induit une mortalité des nauplii et des copépodites à une dose plus faible que pour les parents (1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contre 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pour les parents). Ils montrent également que des PSL de 500 nm induisent une baisse de la fécondité des adultes à toutes les concentrations étudiées (0,125–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) passant de 27 à 10 nauplii par femelles, après 14 jours d'exposition. (Lee et al., 2013).

L'équipe de Pitt a démontré que des PSL de 42 nm inclus dans la nourriture (10% massique) pouvaient être transférés depuis les femelles à leur descendance après une exposition de 7 jours. Les PSL ont été retrouvés dans le jaune des œufs, le tractus gastro-intestinal, le foie et le pancréas des embryons. Ces derniers étaient atteints de bradycardie ainsi que d'une baisse de l'activité de la glutathion réductase impliquée dans le système antioxydant (Figure 8) (Pitt et al., 2018b).

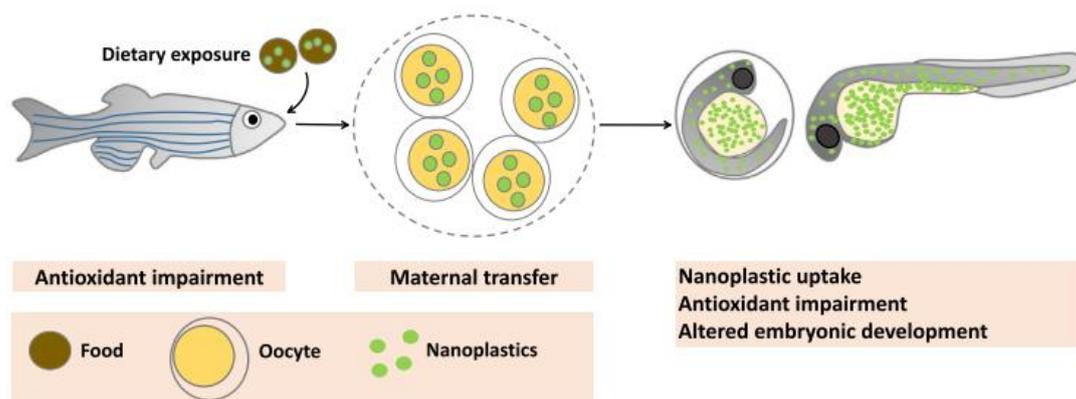


Figure 8 : Transfert trans-générationnel de PSL depuis la femelle poisson zèbre à sa descendance (Pitt et al., 2018b)

Effets liés aux fonctions de surface des PSL

Il semble que les particules chargées positivement aient un impact plus important que celles chargées négativement. Selon Silverstre et al (2011), les PSL de charge positive ont des temps de circulation dans l'organisme plus long que les négatives (Silverstre et al., 2011). Chez les bivalves, comme les huîtres, des nanosphères de polystyrène aminées (PSL-NH₂) chargées positivement (870 nm ; 1000 particule mL⁻¹) pénètrent plus facilement dans les larves et sont séquestrées plus longtemps que des PSL ou des particules anioniques carboxylés (PSL-COOH) (995 nm ; 1000 particule mL⁻¹) (Cole and Galloway, 2015). Nolte et son équipe constatent que les PSL-NH₂ pénètrent plus facilement la paroi de microalgues vertes que des PSL-COOH. Cependant les PSL-NH₂ avaient une taille plus petite que les PSL-COOH (20 nm et 110 nm respectivement ; 10 mg L⁻¹) (Nolte et al., 2017). Il a été montré que des PSL-NH₂ (50 nm), induisaient 83 à 100% de mortalité chez les larves de rotifère aux concentrations de 5 à 50 µg mL⁻¹ ; contrairement aux PSL-COOH (40 nm) qui n'ont eu aucun effet létal après 48h d'exposition. Mais les PSL-COOH avaient formé des agrégats d'environ 1000 nm dans l'eau de mer (Manfra et al., 2017). Tallec et al. montrent que les PSL-NH₂ sont plus toxiques pour les gamètes (EC₅₀= 4,9 mg mL⁻¹) et les embryons (EC₅₀= 0,15 µg mL⁻¹) que les PSL-COOH (EC₅₀= 7.8 µg mL⁻¹ et 11,60 µg mL⁻¹ pour les gamètes et les embryons respectivement). Cependant ce résultat est biaisé si l'on tient compte de l'agrégation des particules. Car si les PSL-NH₂ formaient des petits agrégats de seulement 96 nm dans l'eau de mer, les PSL-COOH faisaient, eux, 3735 nm. (Tallec et al., 2018). D'après l'étude de l'équipe de Nomura, des PSL-NH₂ (100 nm ; 40mg L⁻¹) pénètrent les cellules de levure de bière par endocytose quand le milieu contient 154 mM de NaCl sans induire d'effets sur la mortalité, alors que dans 5 mM de NaCl ils se collent sur la paroi des cellules sans y pénétrer, et entraînent la mortalité des levures à toutes les concentrations étudiées à partir de 15 mg PSL L⁻¹. L'adhésion entre les PSL-NH₂ résulte d'une attirance électrostatique entre la membrane des cellules chargée négativement (-20 mV) et celle des particules chargées positivement (+40 mV). Quand la salinité augmente cela diminue la différence de charge entre les deux objets, passant de Δ= 60 mV à Δ= 20 mV, et donc les forces électrostatiques. (Nomura et al., 2013).

Cependant, Wu et ses collaborateurs montrent que le taux de survie de daphnies est plus impacté par des PSL de 217 nm, (formant des agrégats de 1800 nm) sans fonction de surface ou des PSL-COOH (272 nm, agrégats de 350 nm) ; que par des PSL-NH₂ (92 nm, non agrégés) après

une exposition de 48 h à 20 mg L⁻¹. Les taux de survie sont de 15 ; 20 et 30 % pour les PSL, les PSL-NH₂ et les PSL-COOH respectivement. Ces nanoparticules contenaient initialement de l'éthanol comme surfactant, alors ils comparent ces résultats à des PSL-NH₂ sans surfactant, et montrent que ces PSL s'agrègent (1500 nm) et ne causent aucune toxicité. Les auteurs pensent que la faible toxicité des PSL-NH₂ est due à la présence de l'exosquelette de chitine des daphnies qui a dû les protéger du contact direct des NP avec la peau. Ils observent aussi que la présence de matière organique (acides humiques) inhibe la toxicité des PSL et remonte le taux de survie de 15% à 95% (Wu et al., 2019). Della Torre et al. obtiennent des résultats allant dans le même sens. Les PS-COOH de 40 nm même agrégés (agrégats de 1764 nm) s'accumulent plus dans le tractus digestif d'embryons d'oursin que les PS-NH₂ de 50 nm (formant des agrégats de 89 nm) (Della Torre et al., 2014). Les PSL-COOH (100 nm) peuvent aussi provoquer une augmentation de la production de ROS dans les spermatozoïde d'huîtres contrairement au PS-NH₂, après une exposition de 1 à 5h (1-10 mg L⁻¹) (Gonzlez-Fernandez et al., 2018).

Les recherches de Lunov et al. (2011) montrent que des PSL de 100 nm chargés positivement (-NH₂) ou négativement (-COOH) ont un impact différent selon les cellules avec lesquelles ils entrent en contact (cultures cellulaires humaines). Ainsi les PSL-COOH sont internalisés plus facilement par les macrophages via le processus de phagocytose. Ces cellules se trouvent en grande quantité dans le foie, ce qui explique l'accumulation des PSL-COOH dans cet organe. Les PSL-NH₂, quant à eux, sont plus facilement internalisés dans les monocytes (globules blancs) en entrant par macropinocytose. Les PSL-NH₂ s'accumulent plutôt dans les cellules des xénogreffes tumorales cultivées sur les membranes chorioallantoïque des œufs de poule fécondés. Ils ont également montré que la pénétration des PSL dans les cellules dépend du milieu de dispersion. Dans du sérum les PSL sont opsonisées i.e. recouvertes par les protéines du sérum et peuvent ainsi interagir avec les récepteurs CD64 (récepteurs aux anticorps) des macrophages et les dyamine II (protéines d'endocytose associée aux clathrines) des monocytes.

Transfert trophique

Il y a encore assez peu de publications étudiant les transferts trophiques, mais Cedervall et ses collaborateurs ont montré que des PSL de 25 nm (100 µg L⁻¹) peuvent être transférés depuis l'algue verte *Scenedesmus* sp., vers la daphnie *Daphnia magna*, et enfin vers des poissons dont le comportement et le métabolisme des lipides sont perturbés (Figure 9) (Cedervall et al., 2012). Mattsson et son équipe font le même constat avec des daphnies et des carpes, mais ils observent que les PSL (53 et 180 nm ; 0,1 g L⁻¹) peuvent passer la barrière hémato-encéphalique des poissons (Mattsson et al., 2017). Le transfert trophique des PSL (50 nm ; 50 mg L⁻¹) a également été démontré sur une plus longue chaîne trophique, depuis les micro algues jusqu'à deux espèces de poissons (*Oryzias* sp et un top prédateur cyprinidé) en passant par la daphnie (Chae et al., 2018).

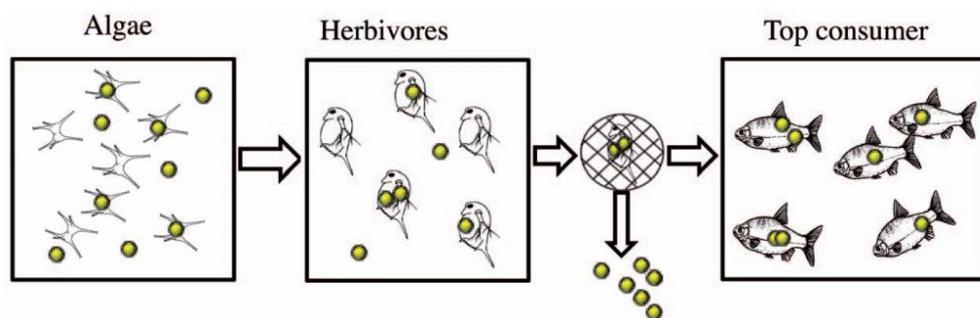


Figure 9 : Transfert trophique de nanosphères de polystyrène (Cedervall et al., 2012)

Impact de l'agrégation des NP

Tout comme les MPt, les NPt sont susceptibles d'avoir une meilleure biodisponibilité lorsqu'ils sont agrégés avec de la matière organique. Cela a été démontré avec des PSL de 100 nm incorporés dans des agrégats de neige marine artificielle ($\approx 10 \mu\text{m}$). Ils ont un taux d'ingestion 20 000 fois plus élevé que des PSL de 10 μm dispersés dans l'eau (10^4 particules mL^{-1}) chez la moule (*Mytilus edulis*) et l'huître (*Crassostrea virginica*). Les auteurs ont conclu que la biodisponibilité des PSL individuels était faible, et que la capture et l'ingestion étaient les principales voies d'exposition pour ces bivalves. (Ward and Kach, 2009).

Étude de NP autres que les PSL

Seules quelques rares études dans la littérature examinent la toxicité de nanoparticules de plastique non sphériques. C'est le cas de Magri et al. qui ont produit des nanoparticules de PET d'environ 100 nm en utilisant l'ablation laser. Ces NP ont des fonctions acide faible à leur surface et des formes irrégulières ce qui les rapproche des PET photodégradés. Ces particules ont pu pénétrer par endocytose et être internés dans les endo-lysosomes des cellules en culture d'épithélium colorectal humain (Magri et al., 2018). Plus récemment, de la poudre de PE (350 μm) ainsi que des MPt de PE provenant du Gyre Nord Atlantique réduits en poudre ont été dégradés à l'aide d'une sonde à ultrason pour produire des nanoparticules proches des nanoplastiques (<450nm). L'impact écotoxicologique a été étudié sur des algues unicellulaires et des bivalves (*Corbicula fluminea*). Les NPt provenant du gyre ont induit une inhibition de la croissance des algues d'eau douce *Scenedemus subspicatus* à toutes les concentrations (1-10 000 $\mu\text{g L}^{-1}$) alors que les nanoparticules provenant de la poudre de PE de référence ont eu un effet uniquement à la plus forte concentration, après 48h d'exposition. Les bivalves quant à eux n'ont pas changé leur comportement de filtration mais la quantité de fèces et pseudo-fèces produites a été accrue, indiquant un possible mécanisme de rejet pour les particules non comestibles (Baudrimont et al., 2019).

1.6 Toxicité due aux additifs

Lorsqu'ils vieillissent et se dégradent, les micro et les nanoplastiques sont susceptibles de libérer leurs additifs comme le résume la Figure 10 (Teuten et al., 2009). Certains de ces additifs peuvent être toxiques et sont avérés comme étant cancérigènes, mutagènes ou perturbateurs endocriniens (Lithner et al., 2011, 2009). Ces additifs sont de différents types :

- pigments composés à partir d'oxydes métalliques,
- plastifiants (Polychlorobiphényle (PCB), phtalates),

- retardateurs de flamme (polybromodiphényléthers (PBDE)),
- monomères (bisphénol A),
- antioxydants (nonylphénol)
- parfums,
- biocides (triclosan),
- nanofibres... (Bouwmeester et al., 2015; Cole et al., 2011; GESAMP, 2015; Kwan et al., 2013; Lithner et al., 2011).

Certains de ces composés peuvent être libérés dans l'environnement et induire des effets toxiques (Lithner et al., 2009) comme le bisphénol A, les PCB, des pesticides chlorés (Teuten et al., 2009), les phtalates (Sajiki and Yonekubo, 2003), ou les PBDE (Kwan et al., 2013).

Une partie de ces additifs sont également des perturbateurs endocriniens comme les phtalates, le bisphénol A, les PBDE, le triclosan... Ils sont nocifs à des concentrations très faibles et peuvent agir sur la physiologie, le comportement ou la reproduction des animaux, et ce, sur plusieurs générations. Le système endocrinien joue un grand rôle dans le développement du fœtus, la reproduction, le comportement et le métabolisme. Or, les perturbateurs endocriniens miment les hormones qui contrôlent ces fonctions, et peuvent les perturber. Les hormones sont secrétées à très faible concentration dans l'organisme, et par conséquent les perturbateurs endocriniens peuvent agir à de très faibles concentrations (Andrady and Rajapakse, 2019; Lithner et al., 2011, 2009; Meeker et al., 2009; Talsness et al., 2009).

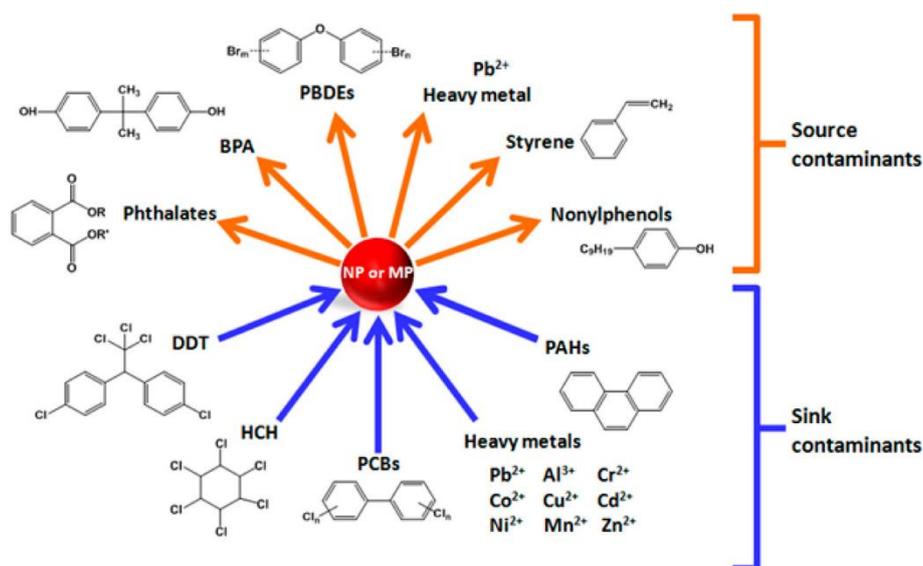


Figure 10 : Polluants pouvant être libérés ou s'adsorber sur les micro et nanoplastiques (Alimi et al., 2018)

1.7 Effet « cheval de Troie »

L'inquiétude de la communauté scientifique au sujet des nanoplastiques vient plutôt de leur potentiel à transporter des polluants à leur surface, plutôt que de leur nature intrinsèque (Koelmans et al., 2013). Ils sont qualifiés de « vecteurs de polluants » ou de « cheval de Troie » (Cole et al., 2011; Koelmans et al., 2016). En effet, les polluants organiques qui sont hydrophobes auront tendance à flotter ou sédimenter quand ils entrent en contact avec les eaux de surface. Mais s'ils s'adsorbent sur les micro et nanoparticules, ils peuvent être transportés le

long de la colonne d'eau, dans les sédiments ou être assimilés par les organismes ; surtout s'ils sont complexés avec de la matière organique (Alimi et al., 2018).

Les plastiques ont une affinité particulière avec les métaux trace comme le cadmium, le plomb, le brome (Davranche et al., 2019; Holmes et al., 2012; Massos and Turner, 2017), les oxydes de fer (Davranche et al., 2019), le cuivre, le zinc, le cobalt, le nickel et l'arsenic (Baudrimont et al., 2019; Holmes et al., 2012) (Figure 10). Cette affinité pour les métaux est indépendante du type de plastique (Rochman et al., 2014a). Les plastiques ont aussi la capacité d'adsorber des polluants organiques persistants (POP) de par leur hydrophobicité (Figure 10). Il peut s'agir des PCB (Lee et al., 2014; Liu et al., 2016; Rochman et al., 2013a; Velzeboer et al., 2014a), HAP (Fries and Zarfl, 2012; Lee et al., 2014; Ma et al., 2016; Rochman et al., 2013a), ou des pesticides organochlorés (Rios et al., 2007). Ainsi des PCB adsorbés sur des granulés de polystyrène peuvent être bioaccumulés dans les glandes uropygiennes d'oiseaux marins (Teuten et al., 2009). C'est aussi le cas chez des poissons zèbres nourris avec des microplastiques (LDPE) contaminés à un mélange de PCB, retardateurs de flamme bromés, composés perfluorés et méthyl-mercure. Les composés perfluorés se sont principalement concentrés dans le foie et le cerveau. Les dommages les plus importants ont été causés dans le foie (altération des tissus, stress oxydant, détoxification) alors que les microplastiques seuls ou les contaminants seuls ont induit moins de dommages (Rainieri et al., 2018). Il a aussi été montré que le benzophénone et le benzo[a]pyrène adsorbés sur des microsphères de PE, peut induire une augmentation du taux de ROS (de 50% et 20% respectivement) chez les embryons de poisson zèbre alors que les MP seules n'ont pas eu d'effet (Cormier et al., 2019). Cela démontre que la toxicité des MP et des NPt peut être induite par les polluants adsorbés à leur surface.

Les polluants peuvent aussi être transférés dans la chaîne trophique. C'est par exemple le cas du benzo[a]pyrène qui, quand il est adsorbé sur des microparticules de plastique, peut être transmis aux nauplii d'artémies puis au poisson zèbre (Batel et al., 2016).

Le danger des nanoparticules est qu'elles peuvent adsorber une quantité beaucoup plus grande de polluants que des microplastiques à cause de l'augmentation exponentielle du ratio surface/volume lors du passage de la taille microscopique à la taille nanométrique, illustré en Figure 11 (Bouwmeester et al., 2015; Oberdörster et al., 2005).

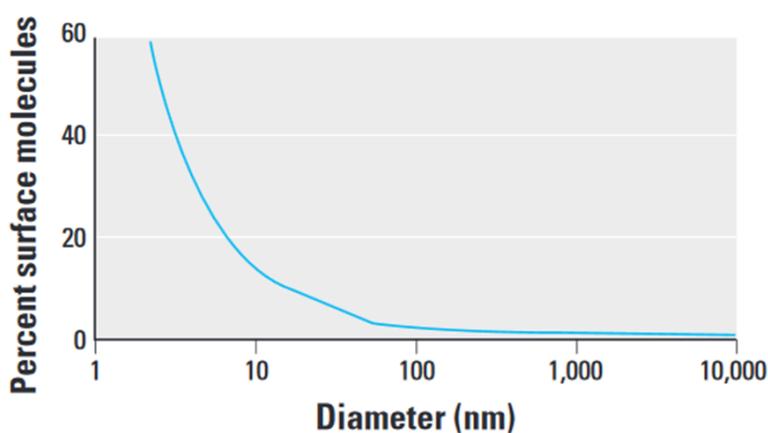


Figure 11 : % de molécules en surface en fonction de la taille des particules. Le nombre de molécules en surface augmente exponentiellement quand la taille des nanoparticules diminue

(<100µm), montrant l'importance du ratio surface/volume dans l'augmentation de l'activité chimique et biologique des nanoparticules (Oberdörster et al., 2005).

La capacité d'adsorption des plastiques peut être augmentée lorsqu'ils vieillissent car ils deviennent poreux et cela augmente leur surface totale. Napper et al. ont montré que des microbilles de PE rugueuses adsorbaient plus de DDT et de phénanthrène que les billes lisses (Napper et al., 2015). C'est également le cas avec des pellets de polystyrène vieillis ou du PVC vieilli qui adsorbent plus les métaux cationiques Cu^{2+} et Zn^{2+} (Holmes et al., 2012; Brennecke et al., 2016).

Pour conclure cette partie sur la pollution par les déchets plastique, voici un schéma récapitulatif sur le devenir des microplastiques dans l'environnement en Figure 12.

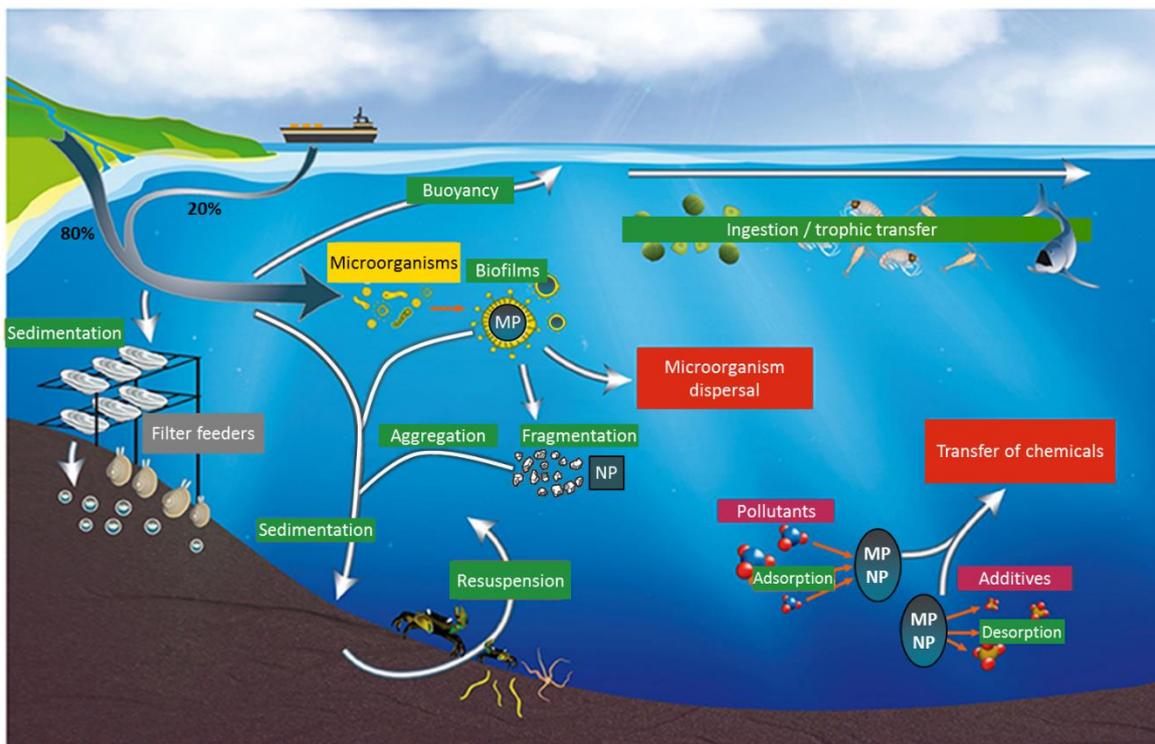


Figure 12 : Devenir des microplastiques dans l'environnement marin (Adapté à partir de Paul-Pont et al., 2018)

II Problématique

Bien souvent, les études écotoxicologiques portant sur les nanoplastiques ne prennent pas en compte les processus physico-chimiques des colloïdes en fonction des conditions naturelles et de leurs dynamiques. Ce sont ces processus qui vont déterminer la biodisponibilité des nanoplastiques. En effet, le comportement des nanoparticules détermine directement leur transport, leur devenir, leur biodisponibilité et leur toxicité (Hotze et al., 2010; Labille and Bottero, 2011). Par rapport au contexte exposé précédemment, plusieurs problèmes peuvent être soulevés. Les multiples études scientifiques portant sur les nanoplastiques, tant du côté physico-chimique qu'écotoxicologique, ne sont la plupart du temps pas représentatives des conditions environnementales.

II.1 Non représentativité des modèles utilisés

Dans la littérature, les études sur les NP de plastique sont essentiellement axées sur des nanosphères de polystyrène de forme homogène, monodispersées (taille uniforme) et comportant des additifs pour les stabiliser comme les surfactants ou des biocides.

Le comportement d'agrégation des NP dans les systèmes aquatiques a été bien étudié pour différents nanomatériaux comme les fullerènes, ou les oxydes métalliques, mais actuellement les informations sur les nanoparticules de plastique sont limitées. Les quelques études physico-chimiques récentes utilisent principalement des PSL (Alimi et al., 2018; Tallec et al., 2019; Wu et al., 2019; Zhang et al., 2019). À notre connaissance, une seule publication a étudié le comportement de NP de plastique de forme irrégulière (PS), qui furent obtenus par ablation laser (Yu et al., 2019).

Mais si les nanosphères standardisées sont appropriées pour l'étalonnage des techniques et des instruments, elles sont très éloignées des nanoplastiques que l'on pourrait retrouver dans l'environnement (Gigault et al., 2018c). Comme nous l'avons démontré, les nanoplastiques sont vieillies par les UV, le sel, les frottements mécaniques. Ils ont une surface poreuse, des tailles variées, des formes irrégulières, une surface oxydée et ils sont associés à de la matière organique. Les propriétés physico-chimiques des PSL sont différentes des nanoplastiques, or, ce sont ces caractéristiques qui déterminent leur comportement, leur devenir, leur biodisponibilité et leur toxicité. (Gigault et al., 2018c).

Par rapport aux données des études écotoxicologiques obtenues et disponibles dans la littérature, l'utilisation de PSL pose plusieurs problèmes (Figure 13):

- Utilisation de nanosphères calibrées en taille non représentatives ;
- Présence d'additifs toxiques (surfactants, biocides) ;
- NP fluorescentes potentiellement toxiques ;
- Concentrations beaucoup plus fortes que celles de l'environnement ;
- Stabilité des particules dans le milieu non prise en compte/mesurée.

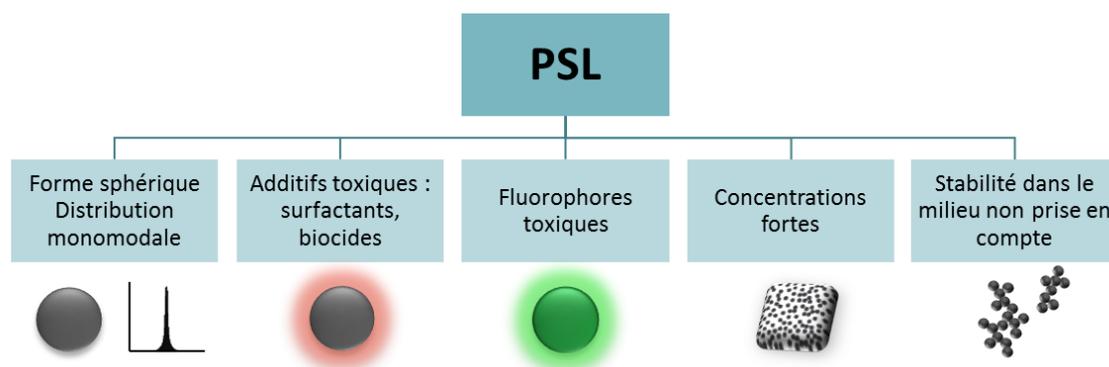


Figure 13 : Caractéristiques générales des PSL

Les PSL ne sont pas représentatifs des nanoplastiques environnementaux, de par leur forme, leur distribution en taille, et leurs caractéristiques de surface ; comme nous l'avons expliqué ci-dessus. Mais en toxicologie, il est courant d'utiliser des PSL fluorescents qui s'avèrent facilement détectables et localisables dans les tissus des êtres vivants. Cependant, ces NP comportent des fluorophores à leur surface qui peuvent être toxiques pour les organismes (Alford et al., 2009; Jensen, 2012). De plus, il a été montré que ces fluorophores peuvent se désorber des NP et s'accumuler dans les tissus de larves de poisson zèbre (Catarino et al., 2019).

La présence d'additifs dans les dispersions de PSL peut également avoir des effets toxiques. Les surfactants couramment utilisés sont non ioniques comme le SDS (sodium dodecylsulphate), le tween®, le triton-X®, qui peuvent être toxiques pour les organismes (Hrenovic and Ivankovic, 2007; Jahan et al., 2008; Rosety et al., 2001). Récemment, l'équipe de Tufenkji (Pikuda et al., 2019) a démontré que la toxicité des PSL carboxylés commerciaux (ceux que la communauté utilise couramment) est dû aux additifs comme l'azoture de sodium (bactéricide) et non aux nanoparticules elles-mêmes. Ils ont démontré cet effet en purifiant les PSL-COOH avant d'exposer les daphnies (Pikuda et al., 2019). Quelques études précisent que les PSL sont lavés par dialyse et centrifugation afin de retirer les additifs, mais elles ne restent que trop minoritaires (Catarino et al., 2019; Cedervall et al., 2012; Cole and Galloway, 2015; Mattsson et al., 2014).

Enfin, il n'y a pas de cohérence dans les PSL utilisés. Chaque équipe et laboratoire scientifique utilise des PSL différents (taille, surfactant, fonctions de surface...) et il est difficile de comparer le comportement de ces NP dans les milieux, ou leur toxicité. Il manque cruellement d'un matériel de référence, représentatif des nanoplastiques, mais également de stratégie analytique pour la communauté scientifique.

II.2 Concentrations non représentatives

Dans le cas de contamination émergente, il est toujours difficile d'estimer une concentration environnementale pour effectuer des tests toxicologiques. Néanmoins, la concentration de microplastiques a été évaluée entre 0,4 et 34 ng L⁻¹ dans des eaux de surface aux États Unis et en Europe, et environ 0,51 mg L⁻¹ pour les eaux marines (Albert A. Koelmans et al., 2015). À partir des prélèvements de micro plastiques il a été possible de modéliser les concentrations probables des nanoplastiques dans les eaux, qui seraient de l'ordre du ng L⁻¹ (Figure 14). Cet ordre de grandeur et également confirmé par Besseling et al. (2017). La Figure 14 illustre le gap entre les concentrations utilisées et les teneurs susceptibles de se retrouver dans l'environnement. La plupart des études de toxicité sont menées à des concentrations en PSL de l'ordre du mg L⁻¹ (Bergami et al., 2016; Brun et al., 2019; Chae et al., 2018; Gonzalez-Fernandez et al., 2018; Wegner et al., 2012) dépassant largement ce que nous pouvons, a priori, trouver dans l'environnement.

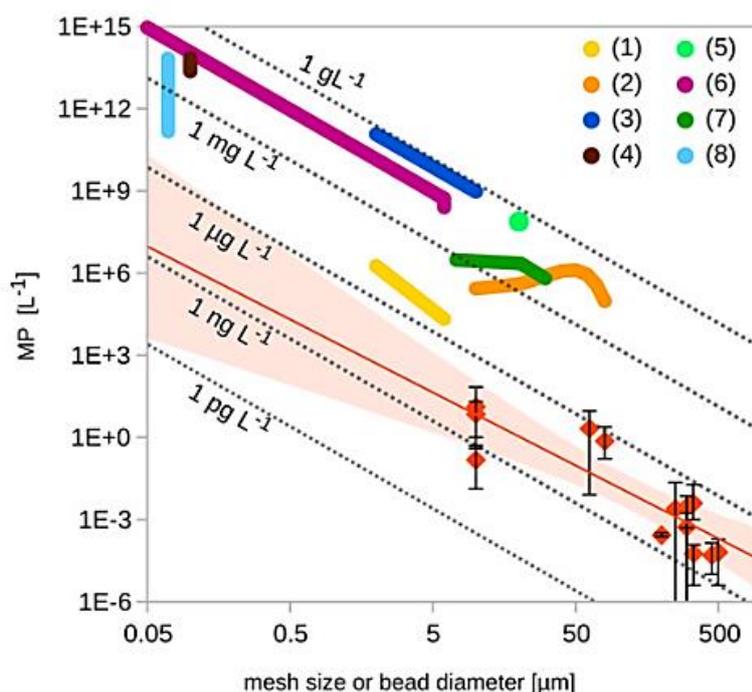


Figure 14 : Concentration en MP utilisés dans les études d'écotoxicologie (lignes épaisses colorées), concentrations des MP observées dans l'environnement (losanges rouges). Les lignes rouges sont une extrapolation des données de terrain. Les isolignes grises montrent la concentration massique pour des particules de densité =1,04g cm⁻³ ((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) Cole et al. 2013; (7) Lee et al., 2013; (8) Besseling et al., 2014; (9) Bhattacharya et al., 2010; (10) Srinivasa Reddy et al., 2006) (schéma repris de Lenz et al., 2016).

II.3 Dispersion dans les milieux non représentative

Stabilité des NP non mesurée dans les études d'écotoxicologie

La stabilité des nanoparticules est un facteur déterminant dans la biodisponibilité et la toxicité, car ces paramètres sont principalement gouvernés par la taille et la forme des NP (Hotze et al., 2010; Labille and Bottero, 2011). La majorité des études écotoxicologiques ne vérifient pas la stabilité des PSL dans le milieu d'exposition. Dans le cas d'études en eau douce (Catarino et al., 2019; Cedervall et al., 2012; Mattsson et al., 2014) ça n'a pas un grand impact, car les PSL sont souvent stables dans ces milieux. Dans le cas d'études en eau de mer (Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Jeong et al., 2016), c'est essentiel car des forces ioniques importantes sont connues pour entraîner l'agrégation des NP (Hotze et al., 2010; Labille and Bottero, 2011). Certaines études remarquent visuellement que les particules se sont agrégées mais ne donnent pas plus de détails (Lee et al., 2013)

La stabilité des nanoparticules de plastique dans le milieu d'exposition n'est que trop rarement étudiée. Plusieurs études ont mesuré le diamètre hydrodynamique des agrégats de nanoplastiques dans le milieu d'exposition mais sans préciser le moment de la mesure. (Bergami et al., 2016; Canesi et al., 2015; Casado et al., 2013; Della Torre et al., 2014; Gambardella et al., 2018; Gonzalez-Fernandez et al., 2018; Manfra et al., 2017; Salvati et al., 2011; Sun et al., 2018; Tallec et al., 2018). Or les cinétiques d'agrégation permettent de définir les caractéristiques de la particule qui va finalement interagir avec les organismes. Si les particules s'agrègent, la taille des agglomérats augmente et leur nombre diminue en

conséquence. L'évolution de ces paramètres a des incidences considérables sur les conditions d'exposition des organismes et donc sur les interprétations qui pourront en découler (Afrooz et al., 2014; Oberdörster et al., 2005). Seules quelques études montrent les courbes de cinétiques d'agrégation des particules (Chen et al., 2011; Nolte et al., 2017; Wegner et al., 2012).

Non prise en compte des gradients de salinité

S'il est intuitivement admis que les nanoplastiques sont issus de la dégradation de fragments de plastique dans l'eau de mer ou sur les plages, il est aussi possible que cette dégradation ait lieu dans les eaux rivières et fleuves (Besseling et al., 2017a). Or, les eaux de surface et souterraines ne sont pas une phase continue et sont en fait constituées de plusieurs systèmes qui peuvent transporter, piéger ou remettre en suspension les nanoparticules (Labille and Bottero, 2011). Ces phénomènes amènent une question cruciale : quel est l'impact de ce transport sur le comportement des nanoplastiques ?

Les études physico-chimiques sur les colloïdes, montrent que les NP s'agrègent en fonction de la force ionique du milieu de dispersion (Hotze et al., 2010; Labille and Bottero, 2011). Les expérimentations récentes visant à évaluer la stabilité des NP de plastique sont effectuées en utilisant des PSL dispersées dans de l'eau MQ qui sont ensuite injectées dans un milieu de force ionique homogène et fixe (Alimi et al., 2018; Tallec et al., 2019; Wu et al., 2019; Zhang et al., 2019). Nous appellerons ce mode de dispersion « dispersion en batch ». Néanmoins, ces expérimentations ne prennent jamais en compte la dynamique spatio-temporelle des propriétés physico-chimiques du milieu, dont notamment les gradients de flux et de force ionique. Et pourtant les particules présentes dans les eaux douces de surface, vont transiter au travers des gradients de force ionique important avant d'atteindre les eaux océaniques : estuaires, lagunes, mangroves...

Les études écotoxicologiques ne tiennent pas compte non-plus de la complexité des milieux aquatiques naturels. Le mode opératoire est similaire d'une étude à l'autre : les PSL sont dispersées dans de l'eau MQ (souvent à forte concentration), puis injectées dans le milieu d'exposition, de façon à obtenir une concentration finale donnée, tout en manipulant un minimum de volume d'échantillon. Si ce mode opératoire ne pose pas de problème pour les contaminants liquides, il est inapproprié pour les NP. En effet, les particules concentrées dans de l'eau douce se retrouvent soudainement dans un milieu avec une certaine force ionique, propice, dans la plupart des cas à leur agrégation (Hotze et al., 2010). Dans ce cas, les effets observés (ou non) pourront être imputés par erreur à des NP alors qu'ils seront liés à des agglomérats. En conséquence, il est possible que les études d'écotoxicologie aient sous-estimé, ou mal estimé, le danger des nanoplastiques de par l'accumulation d'approximations qui rendent ces études non représentatives de l'environnement.

L'enjeu scientifique est donc de déterminer quel est le comportement des nanoplastiques dans les environnements aquatiques, et en particulier au niveau des interfaces eau douce – eau salée, comme les mangroves, qui sont des écosystèmes important pour la biodiversité. Derrière ce comportement environnemental, il s'agira de savoir si les nanoplastiques sont toxiques et d'évaluer les mécanismes d'action.

III Propriétés et caractéristiques des nanoparticules

Dans cette partie, nous présentons une introduction courte à la stabilité colloïdale et les méthodes adaptées à la caractérisation des nanoparticules de plastiques. Ces notions sont importantes car la stabilité colloïdale des nanoparticules sera abordée tout au long du manuscrit ainsi que les outils analytiques associés pour caractériser les propriétés physiques et chimiques permettant de décrire cette stabilité. La technique de diffusion dynamique de la lumière, prépondérante dans l'étude des nanoparticules de plastique de cette thèse, sera détaillée plus en profondeur.

III.1 Introduction à la stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale des nanoparticules contrôle en grande partie leur transport, leur biodisponibilité et dans une certaine mesure leur réactivité. En effet, les caractéristiques des NP, les propriétés physico-chimiques du milieu ainsi que les transformations subies par les NP dans l'environnement vont influencer directement leur stabilité. Pour caractériser celle-ci, il est important de déterminer la capacité d'une nanoparticule à s'agréger ou non dans un système donné.

Brièvement, l'agrégation peut se résumer en deux étapes :

- la collision de deux particules du même type (homo-agrégation) ou deux particules différentes (hétéro-agrégation),
- l'attachement à une surface fixe (déposition).

Le comportement des particules va dépendre des conditions de transport des particules (diffusion) et de la balance entre les forces d'attraction et de répulsion présentes en surface des particules décrit notamment par la théorie *Colloid Filtration Theory* (CFT) et la théorie DeJarguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Deryagin and Landau, 1941; Verwey et al., 1948). Cette dernière, permet de modéliser les interactions particules-particules et particule-surface en sommant les forces électrostatiques répulsives de la double couche électronique, et des forces de Van der Waals attractives en fonction de la distance entre ces deux objets. Si la résultante (V_T) est négative, les forces attractives l'emportent et les deux nanoparticules vont s'associer physiquement. Si à l'inverse, la résultante est positive, les forces dominantes sont répulsives. Si on somme les deux forces à l'interface entre deux nanoparticules en fonction de la distance qui les sépare on obtient la courbe de V_T en Figure 15. Quand les deux particules sont très proches, les forces de Van der Waals dominant et l'attraction est très forte. L'énergie nécessaire pour séparer les deux particules est élevée et rarement rencontrée dans l'environnement. On considère que les particules sont agrégées définitivement. C'est le premier minimum d'énergie. Il existe une distance de séparation particulière où les forces électrostatiques créent une barrière énergétique qui empêche les particules de se séparer plus ou de se rapprocher l'une de l'autre. Cette barrière peut être franchie s'il y a un apport d'énergie extérieure au système qui augmentera le potentiel d'énergie des particules, telle que de l'agitation ou le chauffage du milieu. La hauteur de la barrière énergétique (ϕ_{max}) dépend des propriétés des particules (charge de surface...) et des propriétés du milieu (pH, force ionique...). Il existe un second minimum d'énergie, qui apparaît quand les forces attractives et

répulsives sont du même ordre de grandeur, et qui résulte en une faible attraction qui peut conduire à une agrégation réversible (Labille and Bottero, 2011).

Cependant, la théorie DLVO classique n'est pas suffisante pour modéliser correctement les comportements d'agrégation des particules (Hotze et al., 2010). Plusieurs auteurs ont contribué à enrichir la théorie DLVO en introduisant d'autres forces dans le modèle comme : les forces de répulsion stériques et les forces osmotiques (Fritz et al., 2002), les forces hydrophobes des acides et bases de Lewis (Hoek and Agarwal, 2006) ou les forces magnétiques (Phenrat et al., 2007). La DLVO ainsi enrichie est appelée la DLVO étendue ou XDLVO (Hotze et al., 2010). Notons que dans notre cas, les nanoparticules que nous avons étudiées sont carbonées et particulièrement hydrophobes.

Les travaux de Walz (Suresh and Walz, 1997; Walz, 1998) affinent les théories pour des particules avec une surface rugueuse, en prenant en compte l'influence des changements de forme sur le potentiel d'attraction. Malgré tous ces ajustements, prédire l'agrégation des nanoparticules est particulièrement délicate. Tout d'abord, parce que les équations du modèle reposent sur des hypothèses fortes qui ne sont pas toujours en adéquation avec les particules réelles (surface lisse, géométrie connue, charge de surface diffuse...). De plus, les paramètres du modèle sont sensibles et une petite variation peut fortement changer les résultats. Enfin il n'est pas facile de connaître tous les paramètres influant l'agrégation des particules dans l'environnement, et il peut y avoir des marges d'erreurs importantes.

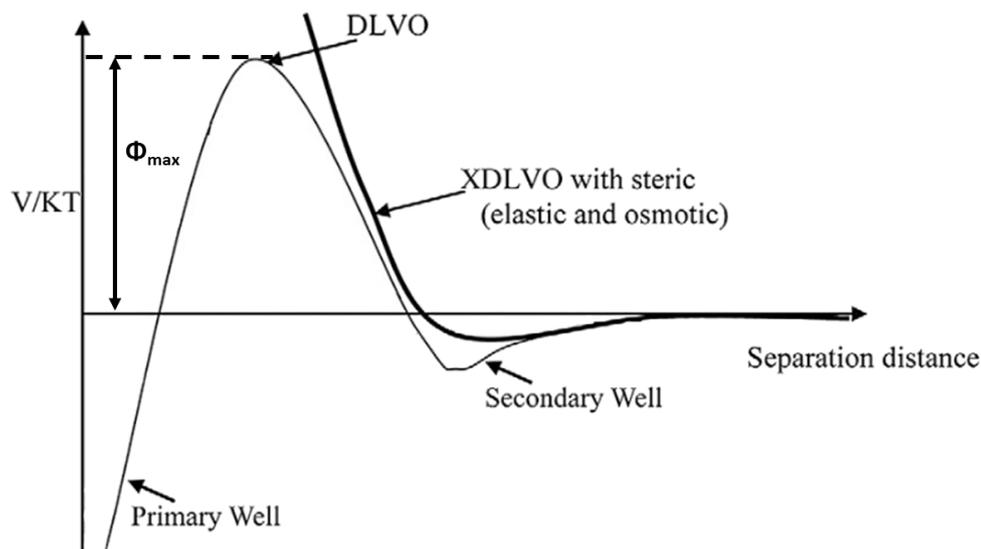


Figure 15 : Représentation de la somme des forces entre deux particules en fonction de la distance qui les sépare, avec la DLVO représentée par la ligne fine, et la DLVO étendue XDLVO en gras. Le premier et le deuxième minimum d'énergie d'attraction (*well*) sont indiqués par des flèches ainsi que l'amplitude de la barrière énergétique répulsive Φ_{max} . V/KT est le rapport de l'énergie potentielle sur la constante de Boltzmann et la température absolue. Repris de (Hotze et al., 2010).

Selon la CFT, la cinétique d'agrégation dépend de la fréquence de collision entre les nanoparticules et l'efficacité de l'attachement durant les collisions. Le coefficient d'attachement α , correspond au ratio du nombre de collisions produisant des agrégats sur le nombre total de collisions et varie entre 0 et 1. Dans une suspension parfaitement stable, toutes

les collisions sont sans succès et $\alpha = 0$. Dans une suspension complètement déstabilisée, toutes les collisions entraînent une agrégation et $\alpha = 1$ (Filella, 2006). Quand α est proche de 1, on considère que l'agrégation est contrôlée par les forces de diffusion, on appelle ce processus la *diffused limitation agregation* (DLA). Dans ce cas, les conditions sont favorables à une agrégation rapide et irréversible des particules. Les agrégats formés sont poreux et ont une structure lâche et ramifié comme l'illustre la figure 16 ci-dessous. Leur masse augmente linéairement avec le temps. En revanche, si $\alpha < 1$, les forces de répulsions dominent. De ce fait, les conditions sont défavorables pour l'agrégation, et la vitesse d'agrégation est lente. On appelle ce processus *Reaction Limited Agregation* (RLA). Les agrégats formés ont une structure plus compacte (Figure 16), car la force d'attraction entre les particules est faible, et les particules peuvent se réarranger dans l'agrégat au cours du temps. Leur masse augmente exponentiellement avec le temps (Filella, 2006; Petosa et al., 2010).

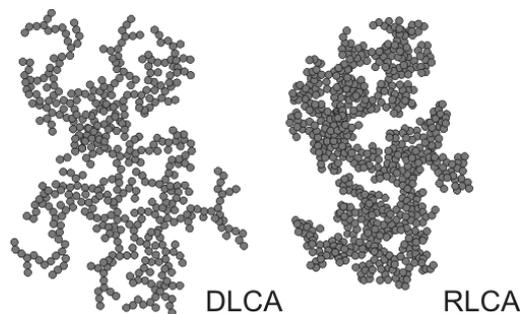


Figure 16 : Morphologie des agrégats formé selon les régimes DLCA et RLCA

La structure des agrégats peut être expliquée simplement par la probabilité de liaison irréversible entre les particules et est illustrée en figure 17. Pour former un agrégat avec une structure poreuse il faut qu'il y ait de nombreux espaces vides. Lorsque les forces d'attraction sont dominantes, la probabilité de liaison irréversible est forte. De ce fait, les particules nouvellement ajoutées lors d'un choc ont une forte probabilité de se coller sur les parties ramifiées avant de pouvoir atteindre les espaces vides de l'agrégat. Dans le cas des agrégats compacts, la force d'attraction entre les particules est faible, et les particules peuvent se réarranger dans l'agrégat au cours du temps pour combler les vides avant de se lier de façon irréversible.

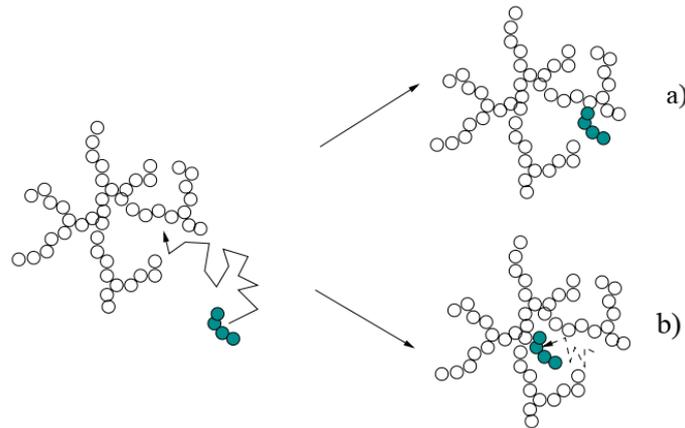


Figure 17 : Illustration de la formation des agrégats selon les processus DLA a) et RLA b). (schéma repris de Thill, 2006).

Mesurer la dimension fractale des agrégats peut être une façon efficace d'évaluer la structure des agrégats (Gigault and Grassl, 2017; Lambert et al., 2000; Limbach et al., 2005; Rizzi et al., 2004; Sterling et al., 2005). Une dimension fractale D_f proche de 3 représente une sphère compacte et une D_f proche de 1 représentera une structure lâche avec une forte porosité. Ainsi dans le régime DLA les agrégats ramifiés ont une dimension fractale D_f de l'ordre de 1,8 et dans le régime RLA les agrégats sont plus compacts avec une D_f entre 1,9 et 2 (Figure 16) (Filella, 2006; Lin et al., 1989a). La vitesse d'agrégation d'une dispersion polydispersée sera toujours plus grande que celle d'une dispersion monodispersée selon Petosa et al. (2010).

Selon la théorie DLVO, quand la force ionique du milieu augmente cela diminue l'épaisseur de la double couche électronique et diminue les forces de répulsion, ce qui entraîne une augmentation de la vitesse d'agrégation. La concentration électrolyte à partir de laquelle on observe une déstabilisation brutale et rapide des colloïdes est appelée la concentration critique de coagulation (CCC). Au-delà de cette concentration, le coefficient d'attachement α atteint la valeur de 1, et même si on augmente la force ionique de la solution, la vitesse d'agrégation restera inchangée. La règle de Schulze–Hardy est la suivante :

$$CCC \sim (1/z)^n$$

Avec z la charge des ions. La valeur de n est égale à 6 ou 2 selon les ions. Cette règle indique que les solutions contenant des ions multivalents auront des CCC plus faibles.

Le coefficient d'attachement peut être déterminé expérimentalement en mesurant l'évolution du diamètre hydrodynamique (via la diffusion de lumière dynamique par exemple, cf section matériels et méthodes du chapitre 2) en fonction du temps. Durant les premiers stades d'agrégation, le diamètre augmente linéairement avec le temps. Cette augmentation $d_h(t)$ dépend de la concentration particulaire initiale (N_0) ainsi que de la constante de la vitesse d'agrégation initiale k (Équation 1).

$$\left(\frac{d_{d_h}(t)}{d_t} \right)_{t \rightarrow 0} \propto k N_0 \quad \text{Équation 1}$$

La vitesse d'agrégation peut être obtenue en déterminant la pente de $d_h(t)$ dans la partie linéaire de la courbe. Le coefficient d'attachement (aussi connu comme le ratio de stabilité inverse $1/W$), peut être calculé en normalisant les pentes obtenues à différentes concentrations en

électrolyte par la pente obtenue dans des conditions d'agrégation favorables, (autrement dit lorsque la concentration d'électrolyte est supérieure à la CCC) (Équation 2). (Chen and Elimelech, 2006a).

$$\alpha = \frac{1}{W} = \frac{k_{slow}}{k_{fast}} = \frac{\frac{1}{N_0} \left(\frac{d_{dh}(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}}{\frac{1}{(N_0)_{fast}} \left(\frac{d_{dh}(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0, fast}} \quad \text{Équation 2}$$

k_{slow} et k_{fast} représentent les vitesses d'agrégation (pentes) gouvernées par les régimes RLA et DLA. Le régime RLA apparait quand la force ionique est en dessous de la CCC, et inversement, le régime DLA se produit au-dessus de la CCC.

Pour déterminer la CCC des particules de façon expérimentale, il faut mesurer l'évolution du diamètre hydrodynamique au cours du temps, pour différentes concentrations en électrolyte. Puis, il faut tracer le coefficient d'attachement, calculé pour chaque condition, en fonction de la concentration en sels. L'intersection des deux tangentes de la courbe permet de trouver la CCC (Figure 18).

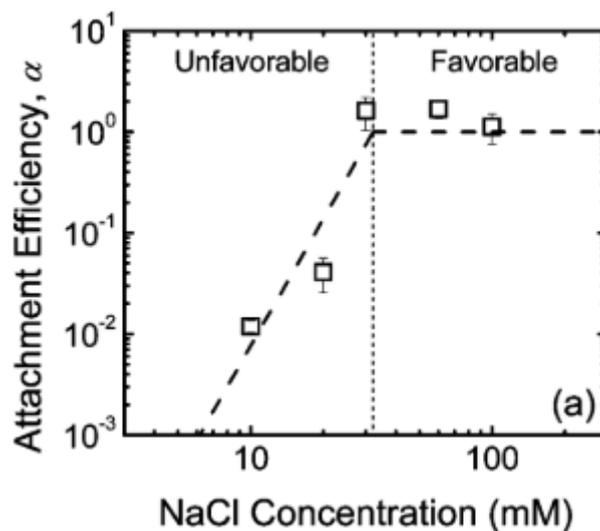


Figure 18 : Détermination de la CCC à partir du coefficient d'attachement (Chen and Elimelech, 2008).

Les facteurs qui peuvent entraîner l'agrégation des particules dans les milieux naturels peuvent être multiples comme illustré en Figure 19 :

- le pH de l'eau peut changer la charge de surface ;
- la force ionique de l'eau diminue la double couche électronique et donc les forces répulsives ;
- certains ions peuvent faire des ponts entre les fonctions de surface des nanoparticules (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ;
- les nanoparticules peuvent s'hétéro-agréger avec les matières en suspension environnantes : s'associer avec des particules en suspension inorganiques ou des bio-

colloïdes, s'infiltrer dans des milieux poreux, les macromolécules peuvent recouvrir les particules ou les piéger dans une matrice gélatineuse ;

- il peut y avoir des interactions avec des organismes vivants : entrer par phagocytose, être dissoutes dans les cellules par un pH acide (nanoparticules métalliques) ;
- les rayons du soleil (UV) et le milieu aqueux peuvent dégrader les surfaces des nanoparticules : les oxyder ou induire des réactions photocatalytiques (Hotze et al., 2010).

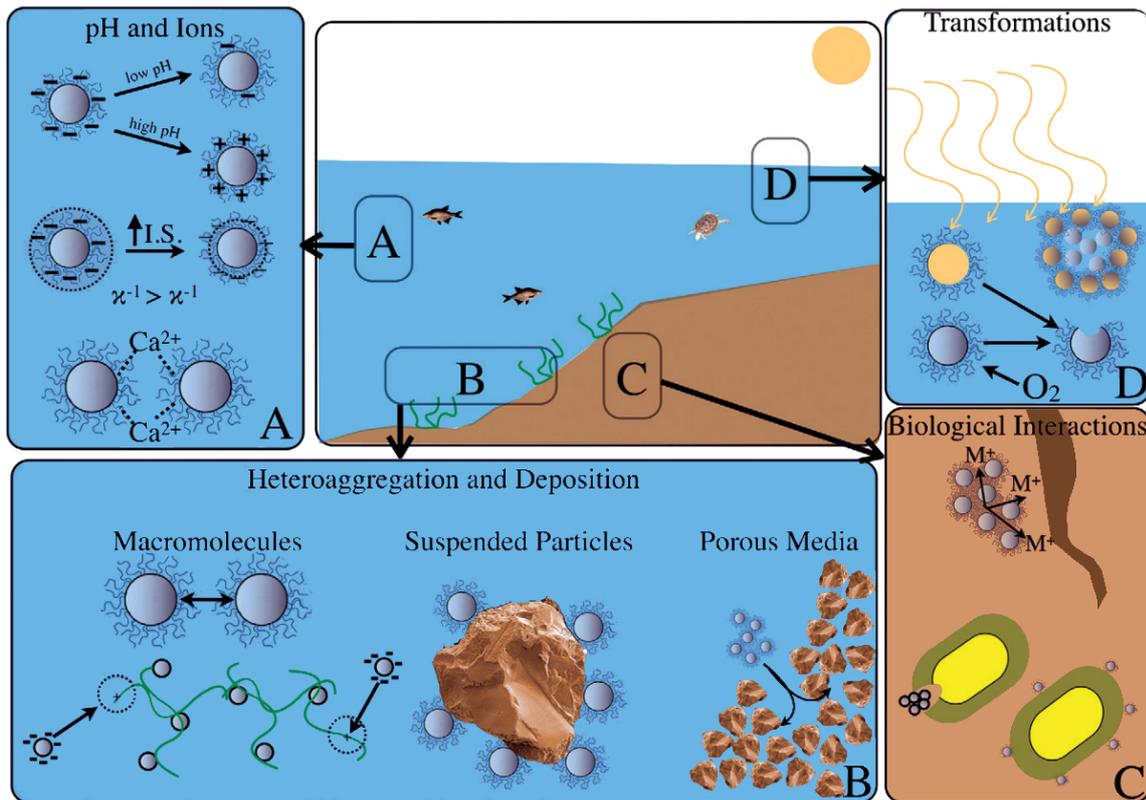


Figure 19 : Influences de l'environnement sur l'agrégation des particules et comment l'état d'agrégation influence les nanoparticules. A) pH, force ionique (I.S.) et ions B) hétéro-agrégation avec des macromolécules, avec des particules en suspension ou circulation dans des milieux poreux C) interactions biologiques, comme la phagocytose en présence d'agrégats de particules. Les nanoparticules métalliques s'agrègent à la surface des organismes et peuvent relarguer des ions métalliques (M+). D) transformations (oxydation, photocatalyse). Dans le cas d'agrégats de particules photo-actives seule la surface exposée est active. (Hotze et al., 2010)

III.2 Les caractéristiques importantes des nanoparticules

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules déterminent directement leur devenir et leur comportement dans l'environnement (sédimentation/flottaison, transport, complexation), mais conditionnent également leur biodisponibilité, leur toxicité ainsi que leur réactivité. Il est donc déterminant de pouvoir caractériser ces propriétés pour évaluer leur comportement et impact sur l'environnement.

Les nanoparticules manufacturées sont idéalisées comme étant monodispersées, sphériques avec des surfaces lisses et propres. Mais ce n'est pas toujours le cas, en particulier quand elles se retrouvent dans l'environnement, où elles vieillissent et se mélangent à des matrices complexes. Les nanoparticules environnementales sont souvent un mélange hétérogène et

complexe, difficile à caractériser. Afin de définir au mieux une nanoparticule il existe plusieurs propriétés à étudier qui sont résumés dans la figure 20.

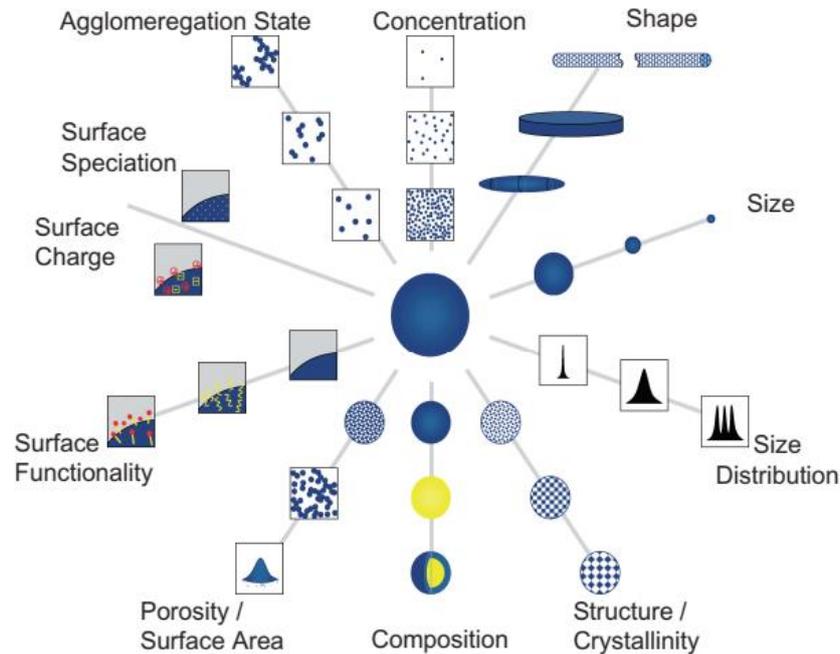


Figure 20 : Propriétés importantes des nanoparticules manufacturées dispersées dans un milieu aquatique. Repris de (Hassellöv et al., 2008)

III.2.1 Taille, surface spécifique et forme

À l'échelle macroscopique, le comportement des particules est déterminé par ses propriétés de sédimentation/flottaison, induite par leur densité et leur forme. En revanche, à l'échelle nanométrique les forces de collision avec les molécules d'eau et les ions deviennent prédominantes sur la gravité (Filella, 2015a). Les nanoparticules peuvent rester en suspension dans la solution et ont un mouvement aléatoire appelé mouvement brownien. Cet effet peut être visible dès que les particules ont une taille de quelques micromètres et devient prédominant quand la taille approche les 100 nm (Hassan et al., 2015).

La taille détermine également la biodisponibilité et la toxicité d'une nanoparticule, car plus elle est petite, plus elle a de chance de passer au travers des membranes biologiques. Salvati et al. (2011) montrent que des polystyrènes latex de 40 à 50 nm de diamètre peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules de poumon en culture et sont séquestrées dans le lysosome. De même, des particules de latex de 40 à 474 nm peuvent être assimilés dans les tissus de poisson Medaka, principalement dans les branchies et les intestins, mais aussi dans le cerveau et les testicules, ce qui signifie que les nanoparticules sont capables de passer la barrière hémato-encéphalique et la barrière hémato-testiculaire (Kashiwada, 2006).

D'autre part, plus une particule est petite plus sa surface spécifique augmente. En effet, plus la taille diminue, plus le ratio surface sur volume augmente. À titre d'illustration 50% de la masse (ou nombre d'atomes) est situé à la surface d'un colloïde de 3 nm, alors qu'une particule de 30 nm n'aura que 5% de sa masse en surface. En conséquence, les propriétés de surface des nanoparticules, comme la capacité d'adsorption ou la réactivité de surface sont considérablement augmentées. Plus la taille des particules diminue, plus la proportion d'atomes

en surface augmente exponentiellement. Pour les particules dont les tailles sont inférieures à 20 nm, la proportion d'atomes en surface devient prédominante. À ce moment-là, les atomes peuvent se réarranger en surface pour minimiser la tension superficielle, et en conséquence la réactivité de surface est très significativement augmentée (Labille and Bottero, 2011).

Les particules environnementales sont rarement monodispersées et sont au contraire des systèmes poly-dispersés. On considère que la distribution en taille est monodispersée si la valeur du PDI est inférieure à 0,05. Au-delà de 0,7 la distribution en taille est polydispersée (cf section *Dynamic Light Scattering* dans le Matériels et méthodes du chapitre 2). La figure 21 ci-dessous illustre des répartitions en taille de particules monodispersées et polydispersées.

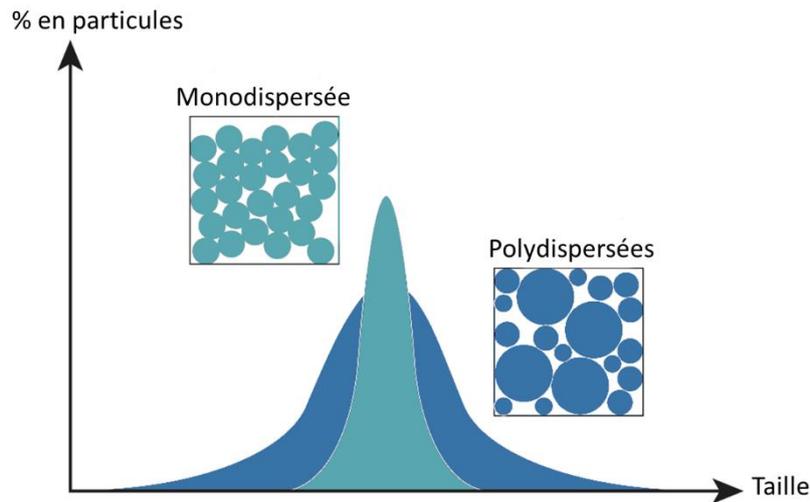


Figure 21 : Distribution en taille de particules monodispersées et polydispersées

Pour cette raison, pour décrire la taille des nanoparticules il est plus pertinent de parler de “distribution en taille de particules”, c'est-à-dire : la quantité relative de particule de chaque classe de taille présente dans un échantillon. Par ailleurs, si les particules sont non sphériques, la mesure de la taille peut devenir relativement abstraite en fonction des techniques utilisées. En effet, en microscopie électronique par exemple, il est possible de connaître les dimensions exactes de la particule (en 2D) mais il faudra alors choisir d'exprimer sa taille selon le diamètre moyen ou la largeur maximum. Dans le cas de la diffusion dynamique de la lumière, qui mesure le diamètre hydrodynamique, celle-ci a tendance à surestimer la taille de la particule car la mesure dépend de la diffusivité de la particule et de sa double couche électronique (Hasselov and Kaegi, 2009).

En conséquence, il est crucial de connaître la morphologie des particules dont on souhaite mesurer la taille. Dans le cas de particules avec un ratio longueur/largeur élevé, c'est à dire en forme de bâtonnets, les propriétés inflammatoires observées sont plus importantes. Comme c'est le cas des fibres d'amiante. Plus récemment, une étude a montré que des nanotubes de carbones multiparois induisent des effets délétères, dans les cellules mésothéliales des poumons de souris, qui dépendent de la longueur des tubes (Poland et al., 2008). Il a aussi été démontré que des nano-bâtonnets d'or (14×74 nm) pénétraient moins les cellules que des nanoparticules sphériques de 14 ou 74 nm (Chithrani et al., 2006).

III.2.2 Concentration

La concentration en particules est également un paramètre important à connaître car elle est déterminante pour la stabilité des particules. En effet, plus les particules sont concentrées plus elles sont proches les unes des autres, et la probabilité de choc entre les particules augmente. Les forces attractives de van der Waals vont conduire à l'agglomération des particules.

Dans le domaine des nanoparticules, il est préférable de mesurer la concentration en nombre de particules plutôt qu'en concentration en masse, compte tenu de la faible masse des particules individuelles. D'autre part, la concentration massique est ambiguë, car à une concentration massique donnée peuvent correspondre plusieurs concentrations particulières en fonction des caractéristiques des particules (taille des particules, distribution mono/polydispersée, hétéro-agrégats, densité...). La conversion de la concentration massique en concentration particulière n'est facile qu'en présence de particules monodispersées sphérique de diamètre connu.

III.2.3 Composition chimique et hydrophobicité

La composition chimique des nanoparticules est importante à caractériser lorsque l'on veut identifier un matériau inconnu ou différencier les nanoparticules d'une matrice environnementales ou faire un suivi de réaction chimique. D'autre part, la composition élémentaire d'une nanoparticule peut être toxique. Par exemple, les nanoparticules d'argent peuvent se dissoudre en présence d'un pH acide (système digestif dans l'organisme ou lysosome dans la cellule) et libérer des ions Ag^{2+} toxiques (Lok et al., 2006). Les nanoparticules peuvent aussi être issues d'un mélange chimique, comme les plastiques qui sont composés de polymères de carbone, auxquels sont ajoutés des additifs tels que les plastifiants (phtalates), pigments (oxydes métalliques), retardateurs de flamme (Brome), bisphénol... Certains de ces composés peuvent être libérés dans l'environnement comme le bisphénol A, les PCBs, des pesticides chlorés (Teuten et al., 2009) ou les phtalates (Sajiki and Yonekubo, 2003) et induire des effets toxiques (Lithner et al., 2009).

La présence de surfactant pour stabiliser les nanoparticules peut également avoir des effets toxiques. L'équipe de Pikuda a étudié la toxicité de nanosphères de polystyrène latex carboxylatées du commerce (20 et 200 nm), contenant des additifs comme l'azoture de sodium (bactéricide). Ils ont montré que la toxicité de ces nanoparticules venait de l'azoture de sodium et non des particules elles-mêmes, car les PS-COOH purifiées n'ont pas causé de mortalité aux daphnies même si leur comportement de nage a été perturbé (Pikuda et al., 2019).

La composition des nanoparticules va aussi conditionner leur comportement hydrophile et/ou hydrophobe. Rappelons que, dans une grande majorité des cas, l'environnement aqueux est celui dans lequel les nanoparticules vont se diffuser, transporter et/ou s'accumuler. Leur affinité plus ou moins forte avec l'eau va conditionner leur stabilité colloïdale mais également leur réactivité.

III.2.4 Charge et fonctions de surface

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la charge des particules influe sur le comportement d'agrégation. Les nanoparticules dispersées dans l'eau vont rapidement réagir avec les ions environnants et gagner ou perdre des protons et des charges. La surface de la particule va attirer des ions de charge opposée que l'on appelle "*counter ions*" et qui vont se lier fortement à la

surface. Ces ions forment la première couche dans la double couche électronique de la nanoparticule et seront dominants sur les ions qui se trouvent dans la couche externe : la couche de diffusion (Figure 22). Théoriquement, les nanoparticules sont stabilisées quand leur charge de surface absolue est forte, car les particules se repoussent. Mais plus le milieu est chargé en ions, plus les particules auront tendance à s'agréger. En effet, l'épaisseur de la double couche électronique, appelée longueur de Debye, diminue car les charges efficaces dans la double couche s'amenuisent. Cela permet aux particules de se rapprocher les unes des autres, de façon suffisamment proche pour que les forces de van der Waals attractives deviennent dominantes et entraînent l'agrégation (Hasselov and Kaegi, 2009).

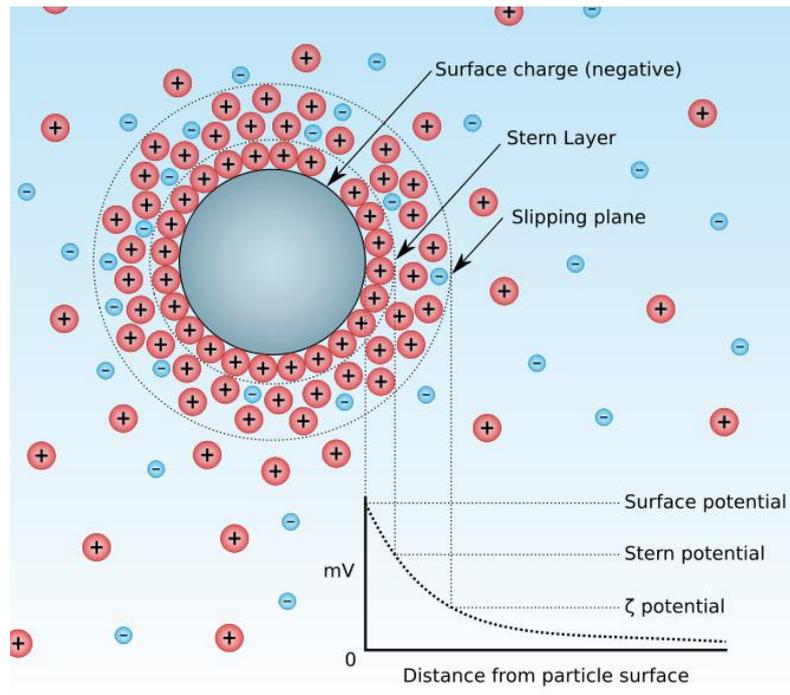


Figure 22 : Schéma de la double couche électronique d'une particule (Cordouan technologies)

Plusieurs études ont montré que la charge de surface était un facteur important dans le transport environnemental (Guzman et al., 2006a) car les réactions chimiques de surface ou la complexation avec la matière organique, peuvent changer les charges des particules et donc influencer leur stabilité ou leur comportement d'agrégation. De plus, la matière organique naturelle (acides humiques) peut recouvrir les surfaces et les charger négativement, ce qui entraîne une stabilisation des nanoparticules (Hyung et al., 2007). La matière organique peut également entraîner la floculation des microparticules et des agrégats de nanoparticules dans le processus de création de la neige marine (sédimentation de débris principalement issus du plancton) (Van Cauwenberghe et al., 2013).

La toxicité peut aussi être influencée par la charge des particules car des polystyrènes latex avec des fonctions amines en surface sont plus toxiques que celles comportant des fonctions carboxylate. Cela peut être expliqué par le fait que les membranes biologiques sont globalement chargées négativement et les latex chargés positivement peuvent interagir plus facilement avec elles (Nomura et al., 2013).

Les fonctions de surfaces sont également déterminantes dans la toxicité des nanoparticules. Ces fonctions sont ajoutées à des particules manufacturées pour leur donner des propriétés

particulières. Par exemple certains médicaments sont des nanocapsules contenant la substance active et ayant des fonctions de surface qui sont reconnues par l'organisme et qui leur permettent d'être adressés vers le tissu cible. Dans la même idée, des nano-bâtonnets d'or fonctionnalisés avec des anticorps de bactérie sont beaucoup plus toxiques pour les bactéries que les mêmes nanoparticules non fonctionnalisées (Sean Norman et al., 2008). Les nanoparticules d'or qui sont utilisées pour l'imagerie cellulaire médicale sont fonctionnalisées avec des PEG pour être biocompatibles. Mais à cause de leurs fonctions de surface, ces particules peuvent induire des effets toxiques chez les organismes aquatiques comme le phytoplancton ou les bivalves (*Corbicula sp.*). Ces particules se lient à la paroi des micro-algues induisant une baisse du taux de survie. Les bivalves qui ont ingéré des algues contaminées, ont des NP d'or qui s'accumulent dans leurs branchies et leur système digestif, causant un stress oxydant (Renault et al., 2008). Les fonctions de surface peuvent donc augmenter la toxicité si elles sont reconnues par l'organisme.

La spéciation de surface est également importante concernant les nanoparticules métalliques qui peuvent s'oxyder dans les solutions aqueuses. L'état d'oxydation de ces particules est appelé spéciation de surface. Cela détermine leur réactivité et leur toxicité (Hasselov and Kaegi, 2009).

III.2.5 Stabilité et agrégation

Comme décrit précédemment, l'agrégation joue également un grand rôle dans le devenir des particules dans l'environnement. Car si les nanoparticules peuvent rester en suspension dans la colonne d'eau, les agrégats sont soumis à d'autres forces de par leur taille, leur forme, leur encombrement/volume, leur structure et la densité des particules qui les compose. Ainsi les agrégats peuvent sédimenter ou flotter en fonction de leurs caractéristiques et être séquestrés dans les sédiments ou être entraînés par les courants et parcourir de longues distances (Besseling et al., 2017a).

L'agglomération des particules fait basculer la distribution en taille du nanomètre au micromètre et influence donc grandement leur biodisponibilité et leur impact écotoxicologique. En effet, les agrégats ont moins de chance de passer les membranes par diffusion non spécifique (Kloepfer et al., 2005) ou par endocytose. Ils seront plutôt assimilés par ingestion et amenés jusque dans l'appareil digestif (Ward and Kach, 2009). Mais d'autres études montrent que les particules agrégées pénètrent plus facilement les cellules que les particules individuelles, comme c'est le cas des particules de cérium en contact avec une culture cellulaire de fibroblastes (Limbach et al., 2005). Dans l'étude de l'équipe de Kashiwada, des nanoparticules de latex agrégées en milieu salé peuvent pénétrer et s'accumuler dans les œufs de poissons Medaka (Kashiwada, 2006).

Le phénomène d'agrégation peut aussi diminuer la réactivité des particules. En effet, les particules agrégées entre elles entraînent une réduction de la surface totale exposée au milieu environnant, surtout si l'agrégat est dense. En conséquence, les réactions catalytiques et photocatalytiques avec les surfaces des particules seront amoindries (Hasselov and Kaegi, 2009).

III.2.6 Structure des agrégats

La structure des agrégats est un autre facteur à prendre en compte en plus de leur taille. En effet un agrégat poreux a une densité efficace plus faible et subit plus de friction hydrodynamique qu'un agrégat compact et dense. Cette structure donne aussi des indications sur le processus de formation de l'agrégat. En effet le processus de "*reaction limited aggregation*" (RLA) est rapide et a tendance à produire des agrégats lâches avec des ramifications espacées, tandis que le processus de "*diffusion limited aggregation*" (DLA) est lent et a tendance à produire des agrégats sphériques et compacts.

Comme il a été dit précédemment que la forme et la taille des particules influence la toxicité, il y a de grandes chances pour que des agrégats de forme fractale évasée ou compacte aient des mécanismes de toxicité différents. Il a été montré que des agrégats de nanoparticules d'or de forme fractale (formés par le processus DLA) sont plus internalisés dans des cellules cancéreuses humaines en culture que des agrégats formés en RLA ou des NP d'or individuelles (Albanese and Chan, 2011) La structure cristalline des nanoparticules est peu étudiée mais des études montrent l'importance de ces structures. Il a été montré que les nanoparticules de dioxydes de titane de forme anatase sont plus photo-actives que les deux autres formes rutile et brookite qui sont peu ou pas actives du tout (Augustynski, 1993). En toxicologie, les quartz cristallin induisent des effets toxiques sur les poumons alors que la silice amorphe a moins d'impact (Castranova, 2000).

III.3 Enjeux analytiques

Jusqu'à ce jour, les nanoplastiques n'ont été que trop peu identifiés et caractérisés dans les environnements naturels (Alimi et al., 2018; Albert A. Koelmans et al., 2015). Le manque de données concernant à la fois le comportement environnemental des nanoplastiques et l'évaluation de leur écotoxicité, est directement dû aux manques d'outils et de méthodes analytiques permettant l'identification, la quantification et la caractérisation des nanoplastiques dans des systèmes naturels.

D'une manière générale, la complexité liée au processus de caractérisation et d'évaluation du devenir des nanoplastiques dans un milieu réside dans la grande variété des paramètres physico-chimiques à prendre en compte. Ces paramètres sont présentés sur la Figure 20 dans la section III.2. Même si la taille des nanoparticules est le principal paramètre contrôlant leur réactivité, de nombreux autres paramètres ont potentiellement une influence sur leurs comportements, transport et accumulation comme : l'état d'agglomération/agrégation, la forme, la dimension fractale, la composition chimique, la chimie de surface ou la solubilité...

Les principaux enjeux analytiques concernant le devenir environnemental et l'impact sur le vivant de nanoparticules en suspensions aqueuses sont liés à plusieurs facteurs:

- à la taille nanométrique et la faible concentration des NPt, dans l'environnement ;
- à la polydispersité et/ou à la diversité de populations des nanoplastiques ;
- à la complexité chimique des matrices environnementales et biologiques associées aux NPt, ayant une influence importante sur leurs propriétés physico-chimiques ;
- aux difficultés dans la préparation d'échantillon, liées notamment aux risques d'artéfacts et de perturbation de la stabilité colloïdale des échantillons ;

- à un manque de méthodes de référence fiables et reproductibles pour la caractérisation des NPt ;
- au manque d'échantillons de NPt de référence pour l'étalonnage et la validation des méthodes analytiques développées.

L'échantillonnage des nanoplastiques est un défi en soit, car du fait de leur taille nanométrique, ils ne flottent pas, et donc ils peuvent être à n'importe quel endroit dans la colonne d'eau. Leur petite taille fait qu'ils passeront au travers des filets d'échantillonnage comme les filets à plancton. Il sera difficile de les séparer des sédiments par des techniques de tamisage ou séparation par densité pour les deux raisons citées ci-dessus (Van Cauwenberghe et al., 2015). Une des seules façons d'échantillonner les nanoplastiques est de prélever l'eau elle-même. Mais du fait de leur dilution, et afin d'avoir une représentation statistiquement viable, la quantité d'eau prélevée devra être conséquente (Bouwmeester et al., 2015).

Le deuxième enjeu est la caractérisation des nanoplastiques. Les plupart des instruments ne sont pas assez sensibles pour détecter des particules de taille nanométrique et sont limités à la gamme micrométrique (Bouwmeester et al., 2015). Mesurer la distribution en taille des particules peut être compliqué, et seules quelques techniques permettent de visualiser de larges gammes de taille (microscopie électronique, NTA). De plus, la dilution extrême des NPt dans l'environnement aquatique estimée, à quelques ng L⁻¹ (Lenz et al., 2016), rend leur détection délicate, et la plupart des instruments ne sont pas assez sensibles (Bouwmeester et al., 2015; Hasselov and Kaegi, 2009). Il paraît donc incontournable de procéder à une pré-concentration des échantillons environnementaux (ultrafiltration tangentielle, évaporation du solvant...), mais l'efficacité peut être faible et elle peut introduire des biais et la déstabilisation de l'échantillon.

En outre, il est important de noter que les eaux de surface sont rarement cristallines et contiennent des matières en suspension (Filella, 2015b). Or, les techniques analytiques capables de détecter les NP ne peuvent généralement pas discriminer la présence de nanoplastiques des autres particules en suspension (Hasselov et al., 2008). En conséquence les données de taille et de concentration seront biaisées s'il n'y a pas une étape de séparation en amont.

Un des challenges important est également d'identifier la nature des nanoplastiques. Les NPt peuvent être également associés à de la matière organique, être inclus dans des matrices complexes ou même dans des tissus vivants. Différencier les NPt de leur matrice ou identifier le type de polymère est difficile car les deux sont potentiellement composés de carbone organique. Or, les techniques qui permettent de détecter et quantifier les carbones organiques vont être perturbées par toutes les matières carbonées présentes dans l'échantillon (Bouwmeester et al., 2015). Il sera donc souvent nécessaire de procéder à une extraction chimique des nanoplastiques pour pouvoir les identifier. En outre, la complexité chimique des matrices environnementales et biologiques, qui sont fortement concentrées en sels et autres entités moléculaires/macromoléculaires (en particulier de la matière organique naturelle), ont une influence importante sur les propriétés physico-chimiques des NPt. Les récents développements analytiques ont permis de mettre en évidence l'efficacité de technologies jusque-là sous-estimées, comme la pyrolyse couplée à la chromatographe gazeuse et à la spectrométrie de masse. Cet outil offre des capacités prometteuses pour l'identification des polymères dans des matrices environnementales.

D'une manière générale, toutes les étapes des protocoles, de l'échantillonnage à la caractérisation en passant par la préparation d'échantillon, pourront affecter la stabilité colloïdale des NPt, modifier leurs caractéristiques physico-chimiques.

Un dernier verrou à l'utilisation de tous ces outils est le manque de nanoplastiques de référence pour le développement et la validation de méthodes pour identifier et caractériser les nanoplastiques dans les matrices complexes. À ce jour, il n'existe pas encore de particules de référence sur laquelle se baser pour qualifier et comprendre le comportement des nanoplastiques. En conséquence, il est encore difficile de d'évaluer la qualité des études scientifiques et de comparer leurs résultats.

L'étude de cette nouvelle forme de pollution est primordiale, car, à ce jour, aucune solution n'existe pour l'évaluer qualitativement et quantitativement (Filella, 2015b; Albert A. Koelmans et al., 2015) et encore moins la traiter. Ce manque d'outils est d'autant plus critique connaissant le peu de données dont nous disposons sur l'impact des nanoparticules de plastique sur le vivant et l'ensemble de la chaîne alimentaire (GEF, 2012).

IV Méthodes de détection et de caractérisation des nanoparticules de plastique

Les différents outils couramment utilisés pour caractériser les nanoparticules d'une manière générale dans l'environnement sont résumés dans la figure 23 en fonction de la gamme de taille des particules et dans le Tableau 1 en fonction des caractéristiques des nanoparticules résumées dans la Figure 7. Ensuite les principales techniques adaptées pour caractériser les nanoplastiques seront détaillées, et en fin de section le tableau 2 résumera leurs gammes de détection et leurs avantages.

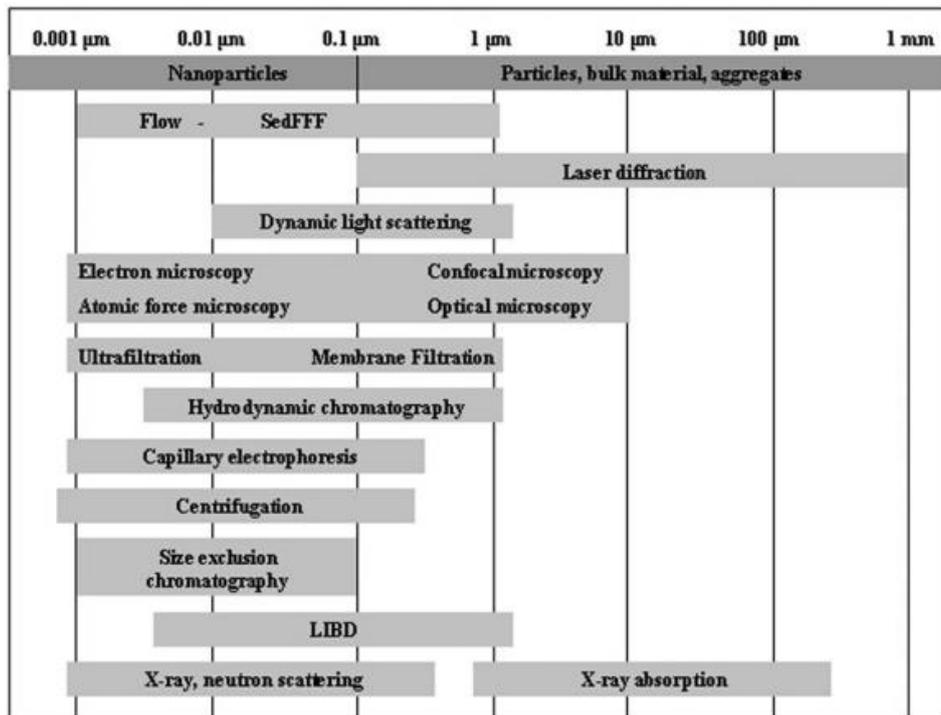


Figure 23 : Comparatifs des techniques d'analyses des nanoparticules en fonctions de leur taille. (Tiede et al., 2008).

Tableau 1: Outils analytiques permettant la caractérisation de nanoparticules et échantillons colloïdaux

Propriétés Physico-Chimiques	Définition	Technique
Taille et Distribution en taille	Gamme de taille d'un échantillon Distribution en taille Mesure donnant une indication sur l'état d'agglomération ou d'agrégation	Diffusion de lumière dynamique (DLS) et statique (SLS) Diffusion de neutron et rayonnement X-Ray aux petits angles (SANS ou SAXS) Laser-Induced Breakdown Detection (LIBD) Microscopie électronique (EM) Microscopie à force atomique (AFM) Mesure de surface spécifique (SSA/BET) Analyseur de mobilité électrique différentielle ((ESI-)DMA) Nanoparticle tracking analysis (NTA) Fractionnement par couplage flux-force (FFF) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Électrophorèse capillaire (CE)
Morphologie	Forme et défaut de forme d'un échantillon Information sur le facteur de forme (ou « aspect ratio ») pour particule non-sphérique Structure cristalline pour matériau cristallin Forme allotropique pour matériaux à la composition similaire	Diffusion de lumière statique (SLS) Microscopie électronique (EM) Microscopie à force atomique (AFM) Fractionnement par couplage flux-force (FFF) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Fluorescence Diffraction X-Ray (XRD) <i>Electron diffraction</i> (ED) Spectroscopie X-Ray par photoémission (XPS)
Composition chimique	Composition élémentaire de l'échantillon Composition de la surface et du noyau de la nanoparticule, et des espèces chimiques associées	Spectroscopie X-Ray photoélectrique/ par photoémission (XPS) Diffraction X-Ray (XRD) Spectrométrie de masse (MS) Spectroscopie Raman UV-Vis Fluorescence Spectroscopie Infra-rouge par transformation de Fourier-FTIR) Résonance magnétique nucléaire (RMN)
Solubilité /Dispersion	Mesure de la quantité de matériaux dissous/dispersé dans un liquide (masse par unité de volume) Information sur l'hydrophobicité /hydrophilicité	Confirmation visuelle Conductivité Diffusion de lumière dynamique (DLS) et statique (SLS) Fractionnement par couplage flux-force (FFF) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Électrophorèse capillaire (CE)
Chimie de Surface et réactivité	Chimie relative à la surface des NP dissous dans un liquide Information sur les interactions NP-solvant	Potentiel Zeta Point isoélectrique (IEP) Spectrométrie de masse (MS) Spectroscopie Raman UV-Vis Fluorescence Spectroscopie Infra-rouge par transformation de Fourier-FTIR) Résonance magnétique nucléaire (RMN) Fractionnement par couplage flux-force (FFF) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Électrophorèse capillaire (CE)

1.1.1 Fractionnement en fonction de la taille des nanoplastiques

1.1.1.1 Filtration membranaire

Pour déterminer la distribution en taille d'un échantillon environnemental certaines méthodes nécessitent souvent une étape de séparation en amont : comme par exemple la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à balayage (TEM), la détection de plasma induite par laser (LIBD)...

Les méthodes de filtration membranaire sont les plus simples et les plus communes des méthodes de séparation. Elles se différencient par leur taille de pore ou leur seuil de séparation de poids moléculaire. Il est possible d distinguer trois catégories: la microfiltration (0,2-10 μm), l'ultrafiltration (1 kDa-100 MDa) et la nanofiltration ou l'osmose inverse (100-1000 Da).

Il existe des filtres de différentes matières (cellulose acétate, nylon...) et avec des revêtements permettant de s'adapter à la nature des particules : hydrophobe/hydrophile, chargé positivement ou négativement... Cette technique a l'avantage d'être simple, peu coûteuse et de s'adapter à des grands comme des petits volumes d'échantillons (filtre cafetière ou seringue respectivement). L'inconvénient de cette technique est que les filtres peuvent se colmater avec les grosses particules. Cela peut avoir pour conséquence de bloquer les petites particules et de causer une perte de matière (El Hadri et al., 2020). Cela peut également entraîner des déchirures dans le filtre lors de filtrations sous vide. La perte de matière peut être vraiment problématique dans les cas d'échantillons peu concentrés avec des particules à l'état d'ultra-trace, comme les échantillons environnementaux. Il faut également tenir compte du phénomène de concentration qui se produit au cours de la filtration. Il y a formation d'un gradient de concentration de particules juste au-dessus du filtre qui peut causer l'agglomération des particules et induire leur dépôt sur le filtre. Pour éviter cet effet de concentration et d'agglomération certains procédés d'ultrafiltration utilisent une chambre pressurisée contenant un agitateur (Hasselov and Kaegi, 2009). Un des autres inconvénients de ces filtres est qu'ils peuvent relarguer des fibres dans l'échantillon et le contaminer. Pour cette raison ces filtres doivent soigneusement être rincés avant toute utilisation.

Une fois les solutions concentrées les outils plus conventionnels (DLS, diffusion statique de la lumière (SLS), TEM, spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS), et autres techniques résumés dans le Tableau 2) peuvent être utilisées pour caractériser les propriétés physiques et chimiques des nanoplastiques.

1.1.1.2 Fractionnement pas couplage flux-force (FFF)

Le fractionnement par couplage flux-force consiste à appliquer un champ extérieur perpendiculaire à l'analyte liquide qui s'écoule de façon laminaire dans un canal. Les particules sont séparées selon différents paramètres physico-chimiques en fonction du type de champ appliqué. Le champ extérieur peut être : un fluide transversal, un champ électrique, thermique, par centrifugation, par écoulement asymétrique. Ce dernier est appelé fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique (*asymetric field flow fractionation*, A4F), et consiste à appliquer un fluide perpendiculaire au fluide laminaire afin de le pousser contre une membrane semi-perméable. Les particules sont séparées selon leur taille (plus précisément leur coefficient de diffusion relatif) de façon plus fine que les méthodes de filtration citées ci-

dessus. Parmi les différentes techniques de fractionnement, ces dernières années le développement de l'A4F s'est avéré être la technique séparative la mieux adaptée pour fractionner les nanoparticules (Baalousha et al., 2011; Lespes and Gigault, 2011). Le fractionnement peut être réalisé selon plusieurs critères, le principal généralement retenu étant la taille. Dès lors, non seulement la taille mais également l'état de dispersion et la forme peuvent être déterminées. Comme il a récemment été démontré, l'A4F-multi-détection peut être appliqué à une grande variété de NP quand une stratégie d'optimisation est rigoureusement appliquée (Gigault et al., 2014). L'A4F est souvent couplée à un détecteur de diffusion statique de la lumière (*Static Light Scattering* (SLS), voir section 1.1.3.3) (Baalousha et al., 2006; Gigault and Grassl, 2017) ou un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, voir 1.1.4.7) (Baik et al., 2007; Hassellöv et al., 1999; Saito et al., 2015) et/ou une détection de plasmas induits par laser (LIBD, section 1.1.3.4) (Baik et al., 2007).

L'A4F apparaît également fortement pertinente pour la caractérisation de nanoplastiques dans un milieu aqueux naturel (Gigault et al., 2017). Néanmoins relativement peu de travaux ont été réalisés sur la caractérisation de ces matériaux, et seulement quelques études ont été conduites sur l'évaluation du couplage A4F avec la pyr-GC-MS pour les nanoplastiques dans les matrices environnementales (Gigault et al. 2020 en cours de soumission). En effet, ce type de couplage peut s'avérer très pertinent pour les études environnementales, de manière similaire à ce qui est déjà réalisés pour les nanoparticules inorganiques en couplant l'A4F à un ICP-MS. Par le développement de cette technique, les résultats obtenus ont permis d'apporter des éléments de réponse aux incertitudes soulignées dans quelques études préliminaires portant sur le comportement des nanotubes de carbone vis à vis de la matière organique (Hyung et al., 2007; Hyung and Kim, 2008; Lu and Su, 2007; Saleh et al., 2010; Su and Lu, 2007; Wang et al., 2008)

L'inconvénient de l'A4F est que les fractions collectées par classe de taille sont significativement diluées par rapport à la concentration de l'échantillon injecté au départ, ce qui rend la mesure des tailles plus difficile (SLS, DLS...).

1.1.2 Augmentation de la Concentration en particules

À la frontière entre le fractionnement par couplage flux-force et la filtration classique, l'ultrafiltration tangentielle est un procédé de filtration dont le flux de liquide est parallèle au filtre, contrairement aux filtres membranes frontaux présentés précédemment, comme présenté en Figure 24.

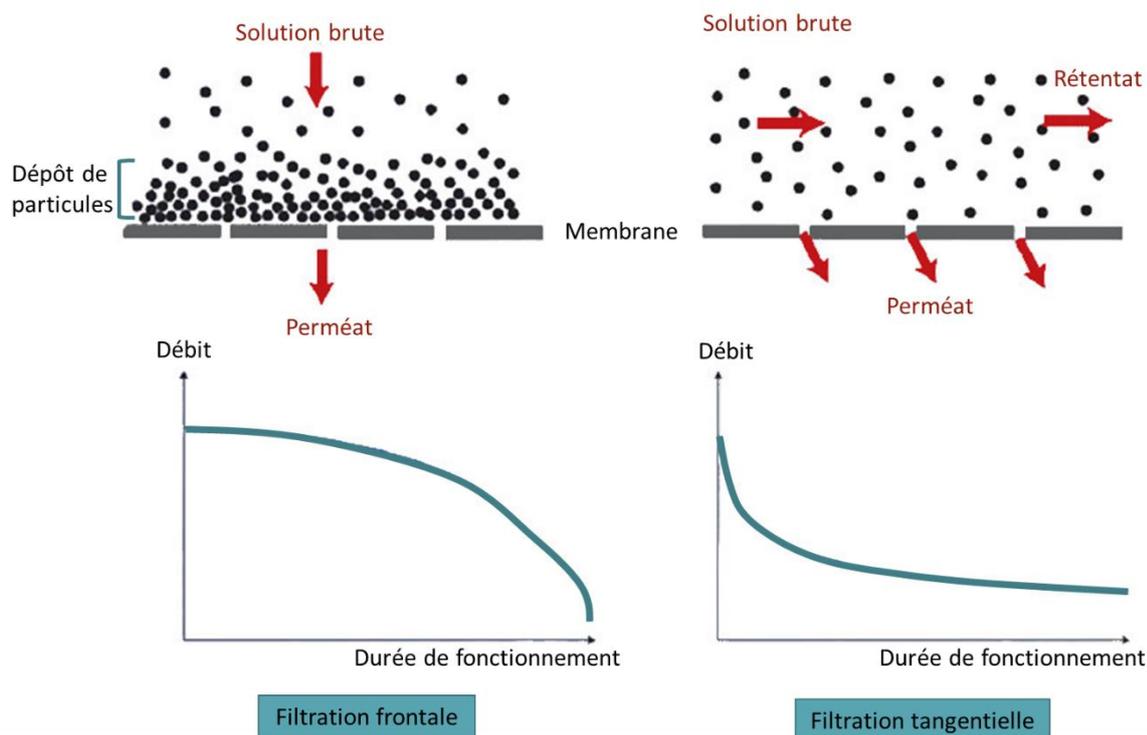


Figure 24 : Comparaison des procédés de filtration frontale classique et de filtration tangentielle. Lors de la filtration frontale le dépôt de particules colmate progressivement le filtre entraînant une diminution du débit. Avec la filtration tangentielle les cisaillements créés au niveau de la membrane empêchent le dépôt de particule, et le débit de filtration reste relativement constant au cours du temps.

Cette méthode permet d'éviter l'effet de concentration des particules au niveau du filtre. Les solutés passent au travers de la membrane (perméat) et la fraction qui est restée au-dessus du filtre contient les particules (rétentat). Cette dernière est recyclée via le réservoir du rétentat. Les composés rejetés par la membrane sont de plus en plus concentrés dans le rétentat au cours du temps. L'ultrafiltration tangentielle permet de concentrer la dispersion d'un facteur 1 à 100 en faisant circuler l'échantillon en circuit fermé. Mais cette méthode de concentration comporte quelques limites. En effet, elle est relativement longue et nécessite un grand volume d'échantillon. De plus, elle peut changer les propriétés physico-chimiques des particules (entraînant une possible agrégation) (Hasselov and Kaegi, 2009; Liu and Lead, 2006) et induire des pertes de matière dues à l'adsorption des particules sur la membrane (Hasselov et al., 2007).

1.1.3 Caractérisation de la taille, forme et concentration :

1.1.3.1 Microscopie :

La microscopie optique conventionnelle à lumière blanche ne permet pas de distinguer des nanoparticules individuelles, mais avec de la lumière UV il est possible d'atteindre une résolution de l'ordre de $0,1\mu\text{m}$. Il est donc délicat de distinguer des particules individuelles en utilisant des microscopes optiques. Néanmoins la microscopie à fluorescence permet, par exemple, de détecter des NP de plastiques marqués par des fluorophores dans les tissus d'organismes et aussi de les quantifier en mesurant l'intensité de la fluorescence (Kashiwada,

2006). Il faut néanmoins que les NP soient suffisamment concentrées dans la zone d'observation. Par ailleurs il est à noter que les tissus de bivalves par exemple peuvent être auto-fluorescents ce qui peut être gênant (Heaney et al., 2011).

La microscopie électronique à transmission ou à balayage : permet d'obtenir une image à haute résolution de l'échantillon, en l'éclairant avec un faisceau d'électrons. Il est nécessaire que la chambre du microscope soit sous vide pour ne pas perturber le flux d'électron.

Dans le cas de la microscopie électronique à transmission (TEM) les électrons qui traversent l'échantillon sont récoltés sur un scintillateur qui permet d'obtenir une image contrastée entre les éléments de l'échantillon qui sont denses aux électrons et ceux qui sont traversés.

La microscopie électronique à balayage consiste à éclairer l'échantillon avec un angle donné afin d'obtenir une image 3D de la surface de l'échantillon. La méthode consiste à mesurer les électrons secondaires qui sont retransmis par l'échantillon lui-même ou par l'échantillon métallisé. La résolution est légèrement inférieure au TEM.

Ces deux techniques sont adaptées pour visualiser les nanoparticules de par leur grande résolution. La résolution d'un SEM moderne est autour de 10 nm, et le TEM entre 0,1 et 1 nm. Elles permettent d'évaluer la taille, la morphologie et la structure des nanoparticules (en 2D pour le TEM et en 3D pour le SEM).

Malgré l'utilisation importante de ces techniques dans le domaine de la caractérisation des nano-objets, elles sont limitées pour les applications environnementales notamment à cause :

- de la faible représentativité de la caractérisation. Du fait du faible volume d'échantillon, et de la forte dilution des nanoplastiques seulement quelques particules peuvent être visualisées à la fois ;
- du temps et de la dépendance de l'opérateur sur la qualité de l'image et de l'interprétation des résultats ;
- des nombreux biais causés par la préparation de l'échantillon. Ces techniques nécessitent le séchage d'un liquide sur une surface causant l'agrégation systématique et incontrôlée de l'échantillon ;
- du faible contraste des nanoplastiques, qui les rend indétectables dans des tissus ou des matrices organiques.

1.1.3.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering* aussi appelée *Photon Correlation Spectroscopy*) est basée sur la diffusion de lumière des nanoparticules agitées par le mouvement brownien. Les variations d'intensité lumineuse sont mesurées à un angle donné, pendant des temps très courts, puis comparées (corrélées) à l'intensité mesurée à t_0 en fonction du temps. Plus les particules seront petites et plus elles se déplaceront rapidement dans le liquide et donc leur variation d'intensité sera rapide. À partir de la courbe d'autocorrélation il est possible d'en déduire le coefficient de diffusion de la particule et donc le diamètre hydrodynamique grâce à la relation de Stokes-Einstein. La mesure est rapide, non destructive et peut être réalisée sans contact avec l'échantillon avec une DLS *in situ*. Cependant la forte dépendance de l'intensité de lumière diffusée avec la taille des particules induit des interférences sur la caractérisation des plus petites tailles. La DLS est détaillée de façon plus approfondie dans la partie matériels et méthodes du chapitre 2.

1.1.3.3 Diffusion statique de la lumière (SLS)

La diffusion statique de la lumière (SLS, *Static Light scattering* aussi appelée *Multiangle light scattering*, MALS) est une technique qui consiste à mesurer la lumière diffusée par les particules en suspension sous différents angles. La taille des particules est ensuite calculée à partir de l'intensité de la lumière diffusée aux différents angles à partir de la théorie de Mie et de la diffraction de Fraunhofer. Cette méthode permet également de calculer la dimension fractale des particules ou des agrégats à partir du rayon de giration, du ratio de Rayleigh et du vecteur d'onde diffusée (*scattering wave vector*) (Gigault and Grassl, 2017). C'est une méthode précise, rapide et non intrusive pour l'échantillon. La sensibilité dépend de la longueur d'onde du laser, de la taille et de la concentration en particules tout comme la DLS. Ainsi la concentration nécessaire pour détecter des particules de taille inférieure à 50 nm est de l'ordre du mg L^{-1} . Cette technique est donc peu adaptée pour des échantillons environnementaux sans ajouter une étape de concentration en amont de l'analyse. Cette technique reste réservée aux particules d'une taille supérieure à 10 nm car l'intensité de la lumière diffusée par des particules plus petites devient très faible (Hasselov and Kaegi, 2009).

1.1.3.4 Détection de plasmas induits par laser (LIBD)

La détection de plasmas induits par laser (*Laser Induced Breakdown Detection*, LIBD) permet d'obtenir la taille et la concentration particulaire de particules entre 5 et 1000 nm, dispersées dans un liquide à des concentrations très faibles jusqu'à 10^3 particules mL^{-1} . En termes de fonctionnement, un laser à impulsions fortement énergétique (jusqu'à plusieurs centaines de microjoules par impulsion, dont la largeur est de l'ordre de la nanoseconde) est focalisé au centre d'une cellule contenant les nanoparticules dispersées dans un liquide en faible concentration. Lorsqu'une particule traverse le spot laser, si l'énergie de l'impulsion est suffisante, un plasma est créé à la surface de la nanoparticule. L'onde acoustique générée est mesurée par un détecteur piézo-électrique et permet de déterminer la probabilité de détection de plasmas en fonction du niveau d'énergie apporté. L'analyse de ce résultat fournit une information sur la présence, la taille et la concentration des colloïdes. Cette technologie est non invasive, quasiment non destructive et particulièrement intéressante pour les petites nanoparticules à l'état d'ultratrace. En revanche, cette grande sensibilité peut nécessiter des étapes de purification ou filtration en amont d'une mesure d'un échantillon environnemental. En effet, la LIBD ne permettant pas de donner des informations sur la composition, il ne sera pas possible de faire la différence entre des matières organiques en suspension, des grains de silice ou des nanoplastiques par exemple. Un chapitre est entièrement consacré à la LIBD en fin de manuscrit (chapitre 4)

1.1.3.5 Analyse du suivi individuel de particules (NTA)

L'analyse du suivi individuel de particules (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) est basée sur la détection de la lumière diffusée par des particules agitées par le mouvement brownien, lorsqu'elles sont éclairées par un laser. Une caméra CCD reliée à un microscope permet de compter le nombre de particules et de mesurer individuellement les trajectoires des particules afin d'en déduire leurs diamètres hydrodynamiques selon l'équation de Stokes-Einstein. La technologie est très proche de la DLS et est donc soumise aux mêmes limitations. Le NTA permet une mesure quantitative en nombre de particules, contrairement à la DLS qui donne une valeur relative en fonction de l'intensité de la lumière diffusée. Avec le NTA, il est possible de

détecter les grosses particules de la même manière que les petites. La gamme de concentrations optimale pour le NTA se situe entre 10^7 et 10^9 particules ml^{-1} (Hasselov and Kaegi, 2009).

1.1.3.6 Carbone organique total (TOC)

Pour mesurer la quantité de carbone organique total, l'échantillon subit une combustion catalytique complète à haute température. Le dioxyde de carbone produit est quantifié par spectroscopie infra-rouge. Cette technique est une des seules qui permet d'évaluer la quantité de plastique dans un échantillon, à condition qu'il n'y ait pas de pollution par d'autres carbones organiques (surfactant, éthanol, matière organique naturelle...). L'avantage, est que la mesure est rapide, peu coûteuse, sensible (seuil de détection est de l'ordre du $\mu\text{g L}^{-1}$) et non dépendante de la taille ou de la forme des particules. Cette technique est destructive, mais elle ne nécessite que quelques millilitres d'échantillon.

1.1.4 Caractérisation chimique

1.1.4.1 Zétamétrie

La zétamétrie permet d'évaluer la charge de surface des particules en suspension dans un liquide en mesurant le potentiel zêta (ζ) et de déterminer la stabilité de la dispersion. Plus le potentiel zêta est grand (en valeur absolue) plus la dispersion est stable, car les particules sont fortement chargées et se repoussent. Le potentiel zêta correspond à la charge des ions entourant la particule dans la double couche électrique (plus précisément dans le plan de cisaillement entre les ions liés à la particule et la couche diffuse, Figure 22 dans la section III.2.4). La charge de surface est évaluée en appliquant un champ électrique dans l'échantillon pour faire migrer les particules entre deux électrodes. La vitesse des particules est proportionnelle à leur potentiel zêta comme indiqué par l'équation de Smoluchowski ci-dessous :

$$v_E = 4\pi\epsilon_0 \zeta \frac{6\pi\mu}{1 + \kappa r} \quad \text{Équation 3}$$

Avec ϵ_0 et ϵ_r les constantes diélectriques relatives et la permittivité électrique du vide, μ est la viscosité de la solution, r est le rayon de la particule et κ est le paramètre de Debye-Hückel qui dépend de la concentration ionique, de la valence des ions en solution, et de la température.

La vitesse des particules est mesurée grâce à un interféromètre laser qui permet de calculer la mobilité électrophorétique et d'en déduire le potentiel zêta (électrophorèse laser doppler). Cette technique est simple, rapide, et nécessite un faible volume d'échantillon. Elle permet de mesurer le potentiel zêta de particules de quelques nanomètres à une centaine de micron. La mesure est limitée à des solvants de force ionique faible, car au-delà d'une certaine charge en minéraux il y a apparition du phénomène d'électrolyse de l'eau qui produit un dégagement gazeux et biaise la mesure.

1.1.4.2 Spectroscopie Raman

L'échantillon est irradié par un laser (de longueur d'onde entre 500 and 800 nm) et interagit avec les atomes par vibration induisant un changement de fréquence dans la lumière diffusée par rapport à la lumière incidente. Ce changement, appelé « shift de Raman », est spécifique à chaque matière et permet donc d'identifier la composition et la structure cristalline de l'échantillon par rapport au spectre d'un polymère de référence. Cette technique est adaptée

pour détecter les liaisons de type C-H ou C=C correspondant aux composés aliphatiques et aromatiques. La spectroscopie Raman est limitée à l'analyse des microparticules mais il est possible de la coupler à un microscope confocal afin de modéliser la composition de surface d'un échantillon de plastique (μ -Raman) (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Cette technologie est non destructive, rapide, facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas de préparation d'échantillon. Cependant, les plastiques colorés ou la fluorescence des tissus biologiques résiduelles peuvent biaiser le spectre Raman et empêcher d'identifier la nature du polymère. Le faisceau laser peut également entraîner une décomposition de l'échantillon par échauffement ou des réactions photochimiques. Comme cette technologie est basée sur la diffraction de la lumière, la résolution varie entre 1 μ m et 250 nm en fonction de la longueur d'onde du laser et du grossissement des lentilles (μ -Raman). Elle est donc peu adaptée aux nanoparticules et peu adaptée aux échantillons très dilués qui diffusent peu la lumière (Imhof et al., 2012; Rocha-Santos and Duarte, 2015).

1.1.4.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) permet d'identifier des polymères inconnus en comparant leur spectre infra rouge à des polymères de composition connue. Les informations obtenues sont complémentaires à celles obtenues en spectroscopie Raman. En effet la FT-IR est adaptée pour détecter les liaisons polaires comme les groupements C=O présents dans les polyesters. La spectroscopie FTIR permet également d'obtenir des informations sur le taux d'oxydation de plastiques vieillis (Corcoran et al., 2009; El Hadri et al., 2020). La spectroscopie « de surface » permet d'identifier les polymères en quelques minutes, à partir de morceaux de plastiques ou de poudre sèche. Cette technique est rapide, facile à mettre en œuvre, non destructive et les échantillons ne nécessitent pas de préparation particulière. Mais, elle n'est pas adaptée pour des suspensions aqueuses car l'eau absorbe dans l'infrarouge et perturbe la mesure. De ce fait, les échantillons doivent être parfaitement secs. D'autre part, les particules noires sont difficiles à identifier à cause de leur forte absorption dans les infra-rouges. Il est également nécessaire de purifier l'échantillon pour une identification précise du polymère. Il est possible de mesurer le spectre infrarouge sur de petites surfaces en couplant le FT-IR à un microscope (Micro-FT-IR). Cela permet de faire une observation microscopique en même temps qu'une modélisation de la composition de surface de microplastiques, même s'ils ont une surface irrégulière. Cependant, si l'on souhaite faire une cartographie précise d'un échantillon entier, cela peut devenir extrêmement chronophage. Tout comme la spectroscopie Raman, la détection des particules est limitée par la longueur d'onde de la lumière (2.5-18 μ m) à cause de la diffraction de la lumière. En conséquence la micro-FTIR est limitée à une résolution de 250 nm (Löder and Gerdts, 2015).

1.1.4.4 Pyrolyse-chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Pyr-GC-MS)

La Pyr-GC-MS permet d'obtenir des informations structurales sur les polymères en analysant les produits de dégradation thermique avec un spectromètre de masse et en les comparant à des polymères de référence. Les échantillons sont pyrolysés à haute température (400-700°C) et les produits de dégradation sont séparés dans la colonne de chromatographie avec un gaz vecteur puis identifiés grâce au spectromètre de masse. La pyrolyse permet d'identifier le type

de polymère ainsi que les additifs. Mais elle est destructive et il est difficile d'identifier tous les types de plastiques (notamment le PVC et le PS qui ont un monomère commun. Il est possible de différencier les polymères des matrices organiques, en préparant l'échantillon avec une digestion chimique de la matière organique ou en ajoutant une étape de désorption thermique (à plus faible température) juste avant la pyrolyse (Fries et al., 2013; Nuelle et al., 2014). La préparation d'échantillon est simple et la quantité nécessaire est faible (≈ 10 ng). La mesure peut être réalisée sur des échantillons secs ou liquides avec une étape d'évaporation à basse température. Il est possible d'identifier des nanoparticules individuelles avec cette technique (Ter Halle et al., 2017).

1.1.4.5 Analyses thermogravimétriques

Les méthodes d'analyse thermogravimétriques mesurent l'évolution de la masse d'un composé en fonction du temps et de la température. L'analyse peut se faire à une température donnée ou selon un profil de température. L'instrument peut être couplé à un GC-MS (TED-GC/MS) ou un FT-IR pour identifier les types de polymères à partir des produits de décomposition thermique ou bien couplés à la calorimétrie différentielle à balayage (TGA-DSC) pour connaître les températures de transition, cristallisation et fusion de l'échantillon. Cette technologie permet d'identifier les polymères dans des échantillons complexes, sans prétraitement et de les quantifier, et ce dans un temps assez court (2-3h). Les polymères identifiables sont le PE, le PP, le PS le PA-6 et le PET par comparaison avec des polymères de référence. Cependant, cette méthode est destructive quand elle est couplée avec les détecteurs cités ci-dessus car l'échantillon est pyrolysé à forte température (900°C).

1.1.4.6 La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie couplée à la microscopie à balayage/en transmission

La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie couplée à la microscopie à balayage/en transmission (*TEM/SEM-energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, SEM-EDS) permet de déterminer la composition des polymères avec une résolution de l'ordre du nanomètre, en plus de l'image de microscopie électronique. L'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon produit des rayons X caractéristiques des éléments présents sur l'échantillon. L'identification des éléments est basée sur la distribution des rayons X en fonction de l'énergie des photons.

Cette technique ne nécessite pas de préparation d'échantillon, elle est rapide, peu onéreuse et nécessite une faible quantité d'échantillon. Elle comporte aussi tous les inconvénients de la microscopie électronique à savoir que les échantillons doivent être mis sous vide et peuvent être détruits pendant l'analyse. La sensibilité de l'instrument est limitée aux éléments de faible numéro atomique Z (Rocha-Santos and Duarte, 2015).

1.1.4.7 La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif ICP-MS :

Cette technologie permet de détecter, quantifier et d'identifier des métaux (et certains non-métaux) à des concentrations très faibles en ionisant l'échantillon avec une torche à plasma. Les ions produits sont captés et séparés selon leur masse et leur charge en utilisant, en général, un analyseur quadripolaire, puis sont analysés à l'aide d'un spectromètre de masse. Ils peuvent être identifiés par comparaison avec des matériaux de référence. L'ICP peut aussi être couplée à la spectrométrie d'émission optique (ICP-OES). Dans ce cas, c'est l'émission de photon par

les atomes ionisés qui est captée puis identifiée, car la longueur d'onde est caractéristique de l'élément. C'est une mesure qui est plus rapide que l'ICP-MS mais elle est moins sensible (limites de détection plus élevées).

L'ICP-MS peut être couplée à un système « *single particle* » afin de faire la mesure sur des nanoparticules individuelles. Cela permet également de connaître la taille des particules. Cette technique nécessite peu d'échantillon et permet de connaître les métaux associés aux micro/nanoplastiques.

1.1.5 Conclusion

Chaque technique analytique décrite dans cette section, et résumé dans le Tableau 2, a ses avantages et ses inconvénients pour caractériser les nanoparticules et chacune donne des informations différentes. Il n'existe pas encore d'instrument qui permette de donner toutes les caractéristiques en une seule mesure. Pour cette raison il est important de comparer les résultats de différentes techniques d'analyse afin de bien caractériser un échantillon de nanoparticules.

Tableau 2 : Résumé des avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées pour caractériser les nanoplastiques.

Technique	Type de caractérisation	Gamme de détection	Avantages
DLS	Distribution en taille	3 à 3000 nm; 1-100ppm	non destructif, peu de préparation d'échantillon, mesure rapide. Peu performant sur les échantillons très polydispersés. Les grosses particules masquent les petites.
NTA	Distribution en taille Concentration particulaire	20 à 1000 nm ppb	Permet d'obtenir la concentration particulaire Résultats dépendant de l'utilisateur Pertinence statistique faible
TEM	Distribution en taille Forme des particules	0,1 à >1000 nm ppb-ppm	Permet de visualiser les NP Le séchage de l'échantillon cause l'agrégation des particules Comptage fastidieux, Pertinence statistique faible Faible contraste des particules carbonées.
SEM	Distribution en taille Forme des particules	10 à >1000 nm ppb-ppm	Permet de visualiser les NP en 3D Le séchage de l'échantillon cause l'agrégation des particules
LIBD	Taille et concentration particulaire	5 à >1000 ppt	Possibilité de mesure des nanoparticules très petites et très diluées Limité à des échantillons peu polydispersés et peu pollués.
A4F-SLS	Séparation par classe de taille, Distribution en taille, Dimension fractale	1-800 nm ppt-ppm	Excellente séparation des particules complexe à optimiser en fonction de l'échantillon
Pyr-GC-MS	Composition des particules	ND	Peu de préparation d'échantillon Quantité d'échantillon faible Mesure possible sur des nanoparticules Identification des polymères même en présence de matière organique Pas de différenciation possible du PVC et du PS.
FT-IR	Composition	ND	Analyse rapide Grande base de donnée Nécessite un échantillon sec Plutôt adapté aux micro-particules
Spectroscopie Raman	Composition des particules	250 nm - 1 µm	Plus adapté aux micro-particules Qualité du spectre varie en fonction des tailles des particules et des paramètres de mesure
Zétamétrie	Charge de surface	-50mV à +60mV force ionique <10mM	Seulement pour des échantillons à faible force ionique

V Bibliographie

- Afroz, A.R.M.N., Hussain, S.M., Saleh, N.B., 2014. Aggregate size and structure determination of nanomaterials in physiological media: importance of dynamic evolution. *J. Nanoparticle Res.* 16. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2771-x>
- Aguirre-Rubí, J.R., Luna-Acosta, A., Etxebarria, N., Soto, M., Espinoza, F., Ahrens, M.J., Marigómez, I., 2018. Chemical contamination assessment in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as biomonitor species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 13396–13415. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9159-2>
- Al-Sid-Cheikh, M., Rowland, S.J., Stevenson, K., Rouleau, C., Henry, T.B., Thompson, R.C., 2018. Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 52, 14480–14486. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05266>
- Albanese, A., Chan, W.C.W., 2011. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano* 5, 5478–5489. <https://doi.org/10.1021/nm2007496>
- Alford, R., Simpson, H.M., Duberman, J., Hill, G.C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H., Choyke, P.L., 2009. Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. *Mol. Imaging* 8, 7290.2009.00031. <https://doi.org/10.2310/7290.2009.00031>
- Alimi, O.S., Farner Budarz, J., Hernandez, L.M., Tufenkji, N., 2018. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environ. Sci. Technol.* 52, 1704–1724. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>
- Almahasheer, H., Serrano, O., Duarte, C.M., Arias-Ortiz, A., Masque, P., Irigoien, X., 2017. Low Carbon sink capacity of Red Sea mangroves. *Sci. Rep.* 7, 9700. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10424-9>
- Andrady, A.L., 2017. The plastic in microplastics: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 119, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Andrady, A.L., Rajapakse, N., 2019. Additives and Chemicals in Plastics BT - Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment, in: Takada, H., Karapanagioti, H.K. (Eds.), . Springer International Publishing, Cham, pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-94-007-698-2_124
- Augustynski, J., 1993. The role of the surface intermediates in the photoelectrochemical behaviour of anatase and rutile TiO₂. *Electrochim. Acta* 38, 43–46. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(93\)80008-N](https://doi.org/10.1016/0013-4686(93)80008-N)
- Auta, H.S., Emenike, C., Fauziah, S., 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013>
- Baalousha, M., Kammer, F.V.D., Motelica-Heino, M., Baborowski, M., Hofmeister, C., Le Coustumer, P., 2006. Size-based speciation of natural colloidal particles by flow field flow fractionation, inductively coupled plasma-mass spectroscopy, and transmission electron microscopy/X-ray energy dispersive spectroscopy: Colloids-trace element interaction. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2156–2162. <https://doi.org/10.1021/es051498d>
- Baalousha, M., Stolpe, B., Lead, J.R., 2011. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *J. Chromatogr. A* 1218, 4078–4103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.063>
- Baik, M.H., Yun, J.I., Bouby, M., Hahn, P.S., Kim, J.I., 2007. Characterization of aquatic groundwater colloids by a laser-induced breakdown detection and ICP-MS combined with an asymmetric flow field-flow fractionation. *Korean J. Chem. Eng.* 24, 723–729. <https://doi.org/10.1007/s11814-007-0033-7>
- Barasarathi, J., Agamuthu, P., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., 2011. Microplastic abundance in selected mangrove forest in Malaysia. *Proceeding ASEAN Conf. Sci. Technol.* 2014, 18-20 August 2014, Bogor, Indones. 4.
- Barnes, D.K. a, Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2016. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1656–1666. <https://doi.org/10.1002/etc.3361>

- Baudrimont, M., Arini, A., Guégan, C., Venel, Z., Gigault, J., Pedrono, B., Prunier, J., Maurice, L., Ter Halle, A., Feurtet-Mazel, A., 2019. Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 3746–3755. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04668-3>
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I., 2016. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.021>
- Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environ. Pollut.* 220, 540–548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>
- Besseling, E., Wang, B., Lurling, M., Koelmans, A.A., Lürling, M., Koelmans, A.A., 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12336–12343. <https://doi.org/10.1021/es503001d>
- 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.). *Environ. Sci. Technol.* 47, 593–600. <https://doi.org/10.1021/es302763x>
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P., Ke, P.C., 2010. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *J. Phys. Chem. C* 114, 16556. <https://doi.org/10.1021/jp1054759>
- Bouwmeester, H., Hollman, P.C.H., Peters, R.J.B., 2015. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8932–8947. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090>
- Brandão, M.L., Braga, K.M., Luque, J.L., 2011. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2246–2249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.07.016>
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 178, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>
- Brillant, M.G.S., MacDonald, B.A., 2000. Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 253, 211–227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00258-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00258-6)
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Hélène Thomas, 2020a. Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere* 254, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126793>
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020b. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environ. Pollut.* 260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113978>
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., da Fonseca, G.A.B., Gerlach, J., Hoffmann, M., Lamoreux, J.F., Mittermeier, C.G., Pilgrim, J.D., Rodrigues, A.S.L., 2006. Global Biodiversity Conservation Priorities. *Science* (80-.). 313, 58 LP – 61. <https://doi.org/10.1126/science.1127609>
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175, 191–199. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9240>
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9175–9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Brun, N.R., van Hage, P., Hunting, E.R., Haramis, A.P.G., Vink, S.C., Vijver, M.G., Schaaf, M.J.M., Tudorache, C., 2019. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval zebrafish. *Commun. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0629-6>
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M.P., Dawson, K.A., Papa, S., Canonico, B., Corsi, I., 2015. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* 111, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>
- Casado, M.P., Macken, A., Byrne, H.J., 2013. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles

- assessed by a multitrophic test battery. *Environ. Int.* 51, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.001>
- Castranova, V., 2000. From Coal Mine Dust To Quartz: Mechanisms of Pulmonary Pathogenicity. *Inhal. Toxicol.* 12, 7–14. <https://doi.org/10.1080/08958378.2000.11463226>
- Catarino, A.I., Frutos, A., Henry, T.B., 2019. Use of fluorescent-labelled nanoplastics (NPs) to demonstrate NP absorption is inconclusive without adequate controls. *Sci. Total Environ.* 670, 915–920. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.194>
- Cedervall, T., Hansson, L.A., Lard, M., Frohm, B., Linse, S., 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032254>
- Chae, Y., Kim, D., Kim, S.W., An, Y.J., 2018. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18849-y>
- Chen, C.S., Anaya, J.M., Zhang, S., Spurgin, J., Chuang, C.Y., Xu, C., Miao, A.J., Chen, E.Y.T., Schwehr, K.A., Jiang, Y., Quigg, A., Santschi, P.H., Chin, W.C., 2011. Effects of engineered nanoparticles on the assembly of exopolymeric substances from phytoplankton. *PLoS One* 6, 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021865>
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2008. Interaction of fullerene (C60) nanoparticles with humic acid and alginate coated silica surfaces: Measurements, mechanisms, and environmental implications. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7607–7614. <https://doi.org/10.1021/es8012062>
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2006. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C60) nanoparticles. *Langmuir* 22, 10994–11001. <https://doi.org/10.1021/la062072v>
- Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., Hollert, H., 2017. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1022–1031. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.156>
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6, 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14625–14632. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04099>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Galloway, T.S., 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1130–1137. <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., Galloway, T.S., 2016. Microplastics Alter the Properties and Sinking Rates of Zooplankton Faecal Pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3239–3246. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05905>
- Corcoran, P.L., Biesinger, M.C., Grifi, M., 2009. Plastics and beaches: A degrading relationship. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.022>
- Cordeiro, C.A.M.M., Costa, T.M., 2010. Evaluation of solid residues removed from a mangrove swamp in the São Vicente Estuary, SP, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1762–1767. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.06.010>
- Cormier, B., Batel, A., Cachot, J., Bégout, M.L., Braunbeck, T., Cousin, X., Keiter, S.H., 2019. Multi-Laboratory Hazard Assessment of Contaminated Microplastic Particles by Means of Enhanced Fish Embryo Test With the Zebrafish (*Danio rerio*). *Front. Environ. Sci.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00135>
- Cozar, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernandez-Leon, S., Palma, A.T., Navarro, S., Garcia-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernandez-de-Puelles, M.L., Duarte, C.M., 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10239–10244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111>
- Davranche, M., Veclin, C., Pierson-Wickmann, A.C., El Hadri, H., Grassl, B., Roweczyk, L., Dia, A., Ter Halle, A., Blanco, F., Reynaud, S., Gigault, J., 2019. Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. *Environ. Pollut.* 249, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.087>
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K.A., Corsi, I., 2014. Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12302–12311. <https://doi.org/10.1021/es502569w>
- Deryagin, B. V, Landau, L.D., 1941. Theory of stability of strongly charged lyophobic sols and adhesion of

- strongly charged particles in electrolytic solutions. *J. Exp. Theor. Phys* 11, 802.
- Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A.D., 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Mar. Pollut. Bull.* 98, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.051>
- Duarte, C.M., Losada, I.J., Hendriks, I.E., Mazarrasa, I., Marbà, N., 2013. The role of coastal plant communities for climate change mitigation and adaptation. *Nat. Clim. Chang.* 3, 961–968. <https://doi.org/10.1038/nclimate1970>
- El Hadri, H., Gigault, J., Maxit, B., Grassl, B., Reynaud, S., 2020. Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments. *NanoImpact* 17, 100206. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100206>
- Eriksen, M., Thiel, M., Lebreton, L., 2019. Nature of Plastic Marine Pollution in the Subtropical Gyres BT - Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment, in: Takada, H., Karapanagioti, H.K. (Eds.), *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment*. Springer International Publishing, Cham, pp. 135–162. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13
- Eriksson, C., Burton, H., 2003. Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. *AMBIO A J. Hum. Environ.* 32, 380–384. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-32.6.380>
- FAO, 2007. *La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture*, Agriculture.
- Filella, M., 2015a. Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: methodological and conceptual aspects. *Environ. Chem.*
- Filella, M., 2015b. Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: Methodological and conceptual aspects. *Environ. Chem.* 12, 527–538. <https://doi.org/10.1071/EN15012>
- Filella, M., 2006. *Colloidal Properties of Submicron Particles in Natural Waters*. *Environ. Colloids Part.*, Wiley Online Books. <https://doi.org/doi:10.1002/9780470024539.ch2>
- Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 1949–1956. <https://doi.org/10.1039/c3em00214d>
- Fries, E., Zarfl, C., 2012. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1296–1304. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0655-5>
- Fritz, G., Schädler, V., Willenbacher, N., Wagner, N.J., 2002. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir* 18, 6381–6390. <https://doi.org/10.1021/la015734j>
- Galloway, T.S., 2015. Micro- and Nano-plastics and Human Health BT - Marine Anthropogenic Litter, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 343–366. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13
- Gambardella, C., Morgana, S., Bramini, M., Rotini, A., Manfra, L., Migliore, L., Piazza, V., Garaventa, F., Faimali, M., 2018. Ecotoxicological effects of polystyrene microbeads in a battery of marine organisms belonging to different trophic levels. *Mar. Environ. Res.* 141, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.023>
- GEF, 2012. *Impacts of Marine Debris on Biodiversity: Current Status and Potential Solutions*. Montréal.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., Gehr, P., 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 1555–1560. <https://doi.org/10.1289/ehp.8006>
- GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment”, *Reports and Studies GESAMP*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3803.7925>
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gigault, J., Balaesque, M., Tabuteau, H., 2018a. Estuary-on-a-chip: Unexpected results for the fate and transport of nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 5, 1231–1236. <https://doi.org/10.1039/c8en00184g>
- Gigault, J., El Hadri, H., Reynaud, S., Deniau, E., Grassl, B., 2017. Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 6761–6769. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0629-7>
- Gigault, J., Grassl, B., 2017. Improving the understanding of fullerene (nC 60) aggregate structures: Fractal dimension characterization by static light scattering coupled to asymmetrical flow field flow fractionation. *J. Colloid Interface Sci.* 502, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.001>
- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.Y., Gauffre, F., Phi, T.L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018b. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034.

- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci. Nano* 3, 346–350. <https://doi.org/10.1039/C6EN00008H>
- Gigault, J., Pettibone, J.M., Schmitt, C., Hackley, V.A., 2014. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 809, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021>
- Gonzalez-Fernandez, C., Tallec, K., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Suquet, M., Berchel, M., Paul-Pont, I., 2018. Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles. *Chemosphere* 208, 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.039>
- Guzman, Katherine A. Dunphy, Finnegan, M.P., Banfield, J.F., 2006. Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7688–7693. <https://doi.org/10.1021/es060847g>
- Guzman, Katherine A Dunphy, Taylor, M.R., Banfield, J.F., 2006. Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding, 2000–2004. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1401–1407. <https://doi.org/10.1021/es0515708>
- Handy, R.D., Henry, T.B., Scown, T.M., Johnston, B.D., Tyler, C.R., 2008. Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish - A mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17, 396–409. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>
- Hassan, P.A., Rana, S., Verma, G., 2015. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* 31, 3–12. <https://doi.org/10.1021/la501789z>
- Hasselov, M., Kaegi, R., 2009. Analysis and Characterization of Manufactured Nanoparticles in Aquatic Environments, Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology. <https://doi.org/10.1002/9781444307504.ch6>
- Hasselöf, M., Lyvén, B., Haraldsson, C., Sirinawin, W., 1999. Determination of Continuous Size and Trace Element Distribution of Colloidal Material in Natural Water by On-Line Coupling of Flow Field-Flow Fractionation with ICPMS. *Anal. Chem.* 71, 3497–3502. <https://doi.org/10.1021/ac981455y>
- Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles 344–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0225-x>
- Hasselöf, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17, 344–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0225-x>
- Hasselov, M., von der Kammer, F., Beckett, R., 2007. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules by field-flow fractionation. *IUPAC Ser. Anal. Phys. Chem. Environ. Syst.* 10, 223.
- Heaney, S.A., Maloy, A.P., Slater, J.W., 2011. Evaluation of fixatives and autofluorescence reduction treatments for marine bivalve larvae. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 91, 1567–1576. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0025315411000208>
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Hoek, E.M. V, Agarwal, G.K., 2006. Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 298, 50–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.12.031>
- Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environ. Pollut.* 160, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052>
- Hotze, E.M., Phenrat, T., Lowry, G. V., 2010. Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *J. Environ. Qual.* 39, 1909–1924. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0462>
- Hrenovic, J., Ivankovic, T., 2007. Toxicity of anionic and cationic surfactant to *Acinetobacter junii* in pure culture. *Cent. Eur. J. Biol.* 2, 405–414. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0029-7>
- Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.H., 2007. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environ. Sci. Technol.* 41, 179–184. <https://doi.org/10.1021/es061817g>
- Hyung, H., Kim, J.-H., 2008. Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4416–4421.
- 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. <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.524>

- Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., Silva-Cavalcanti, J.S., Araújo, M.C.B., 2014. Plastic debris retention and exportation by a mangrove forest patch. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.011>
- Jahan, K., Balzer, S., Mosto, P., 2008. Toxicity of nonionic surfactants. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 110, 281–290. <https://doi.org/10.2495/ETOX080301>
- 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* (80-.). 347, 768–771. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415386.010>
- Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Kržan, A., 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 219, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037>
- Jensen, E.C., 2012. Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations. *Anat. Rec.* 295, 2031–2036. <https://doi.org/10.1002/ar.22602>
- Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.J., Lee, J.S., 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonot Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 8849–8857. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01441>
- Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect.* 114, 1697–1702. <https://doi.org/10.1289/ehp.9209>
- Kloepfer, J.A., Bradforth, S.E., Nadeau, J.L., 2005. Photophysical Properties of Biologically Compatible CdSe Quantum Dot Structures. *J. Phys. Chem. B* 109, 9996–10003. <https://doi.org/10.1021/jp044581g>
- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3315–3326. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069>
- Koelmans, Albert A, Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Marine Anthropogenic Litter. *Springer Open*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Koelmans, Albert 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, pp. 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., 2013. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7812–7820. <https://doi.org/10.1021/es401169n>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., He, Z., 2013. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Kwan, C.S., Takada, H., Mizukawa, K., Torii, M., Koike, T., Yamashita, R., Rinawati, Saha, M., Santiago, E.C., 2013. PBDEs in leachates from municipal solid waste dumping sites in tropical Asian countries: phase distribution and debromination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4188–4204. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1365-3>
- Labille, J., Bottero, J.-Y., 2011. Fate of Nanoparticles in Aqueous Media BT - Nanoethics and Nanotoxicology, in: Houdy, P., Lahmani, M., Marano, F. (Eds.), *Nanoethics and Nanotoxicology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 291–324. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20177-6_13
- Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., Caruso, A., 2016. Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environ. Pollut.* 215, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.006>
- Lambert, S., Thill, A., Ginestet, P., Audic, J.M., Bottero, J.Y., 2000. Structural interpretations of static light scattering patterns of fractal aggregates: I. Introduction of a mean optical index: Numerical simulations. *J. Colloid Interface Sci.* 228, 379–385. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6965>
- Lambert, S., Wagner, M., 2016a. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 145, 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.078>
- Lambert, S., Wagner, M., 2016b. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere* 161, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.042>
- Lavers, J.L., Bond, A.L., 2017. Exceptional and rapid accumulation of anthropogenic debris on one of the world's most remote and pristine islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 6052–6055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619818114>
- Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science* (80-.). 329, 1185–1188.

- <https://doi.org/10.1126/science.1192321>
- Lee, H., Shim, W.J., Kwon, J.H., 2014. Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1545–1552. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.023>
- 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*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11278–11283. <https://doi.org/10.1021/es401932b>
- Lenz, R., Enders, K., Nielsen, T.G., 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E4121–E4122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606615113>
- Lespes, G., Gigault, J., 2011. Hyphenated analytical techniques for multidimensional characterisation of submicron particles: a review. *Anal. Chim. Acta* 692, 26–41.
- Lima, A.R.A., Costa, M.F., Barletta, M., 2014. Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. *Environ. Res.* 132, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.031>
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D., Stark, W.J., 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9370–9376. <https://doi.org/10.1021/es051043o>
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., Meakin, P., 1989. Universality in colloid aggregation. *Nature* 339, 360–362. <https://doi.org/10.1038/339360a0>
- Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products - Screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74, 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.022>
- Lithner, D., Larsson, A., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci. Total Environ.* 409, 3309–3324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Liu, L., Fokkink, R., Koelmans, A.A., 2016. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to polystyrene nanoplastic. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1–6. <https://doi.org/10.1002/etc.3311>
- Liu, R., Lead, J.R., 2006. Partial validation of cross flow ultrafiltration by atomic force microscopy. *Anal. Chem.* 78, 8105–8112.
- Löder, M.G.J., Gerdts, G., 2015. Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal, in: *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, pp. 201–227.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F., Che, C.-M., 2006. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5, 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., Soudant, P., 2015. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Mar. Chem.* 175, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003>
- Lourenço, P.M., Serra-Gonçalves, C., Ferreira, J.L., Catry, T., Granadeiro, J.P., 2017. Plastic and other microfibers in sediments, macroinvertebrates and shorebirds from three intertidal wetlands of southern Europe and west Africa. *Environ. Pollut.* 231, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.103>
- Lu, C., Su, F., 2007. Adsorption of natural organic matter by carbon nanotubes. *Sep. Purif. Technol.* 58, 113–121.
- Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., Nienhaus, G.U., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Simmet, T., 2011. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano* 5, 1657–1669. <https://doi.org/10.1021/nn2000756>
- Lusher, A.L., McHugh, M., Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028>
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., Ji, R., 2016. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environ. Pollut.* 219, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>
- Magri, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Pompa, P.P., Fragouli, D., 2018. Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano* 12, 7690–7700. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01331>
- Manfra, L., Rotini, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., Corsi, I., 2017. Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.068>

- Martin, C., Almahasheer, H., Duarte, C.M., 2019. Mangrove forests as traps for marine litter. *Environ. Pollut.* 247, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.067>
- Massos, A., Turner, A., 2017. Cadmium, lead and bromine in beached microplastics. *Environ. Pollut.* 227, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.034>
- Mattsson, K., Ekvall, M.T., Hansson, L.A., Linse, S., Malmendal, A., Cedervall, T., 2014. Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. *Env. Sci Technol.* <https://doi.org/10.1021/es5053655>
- Mattsson, K., Hansson, L.-A., Cedervall, T., 2015. Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 1712–1721. <https://doi.org/10.1039/C5EM00227C>
- Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L.A., Cedervall, T., 2017. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci. Rep.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10813-0>
- McLeod, E., Chmura, G.L., Bouillon, S., Salm, R., Björk, M., Duarte, C.M., Lovelock, C.E., Schlesinger, W.H., Silliman, B.R., 2011. A blueprint for blue carbon: toward an improved understanding of the role of vegetated coastal habitats in sequestering CO₂. *Front. Ecol. Environ.* 9, 552–560. <https://doi.org/10.1890/110004>
- Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H., 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2097–2113. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0268>
- Mittermeier, R., Turner, W., Larsen, F., Brooks, T., Gascon, C., 2011. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots, in: *Biodiversity Hotspots*. pp. 3–22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1
- Mohamed Nor, N.H., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore’s coastal mangrove ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.025>
- Mohammed, A., Farrell, A.D., Gobin, J., Agard, J.B., 2014. Effects of freshwater flooding on mangroves in the Caribbean Region, in: *Flooding and Climate Change: Sectorial Impacts and Adaptation Strategies for the Caribbean Region*. Nova Publisher, pp. 73–96.
- Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.03.032>
- Naji, A., Esmaili, Z., Khan, F.R., 2017. Plastic debris and microplastics along the beaches of the Strait of Hormuz, Persian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* 114, 1057–1062. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.032>
- Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar. Pollut. Bull.* 99, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>
- NOAA, n.d. Great Pacific Garbage Patch [WWW Document]. URL <https://marinedebris.noaa.gov/info/patch.html>
- Nolte, T.M., Hartmann, N.B., Kleijn, J.M., Garnæs, J., van de Meent, D., Jan Hendriks, A., Baun, A., 2017. The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquat. Toxicol.* 183, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.005>
- Nomura, T., Miyazaki, J., Miyamoto, A., Kuriyama, Y., Tokumoto, H., Konishi, Y., 2013. Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to functionalized polystyrene latex nanoparticles: Influence of surface charge on toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3417–3423. <https://doi.org/10.1021/es400053x>
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- Nuelle, M.T., Dekiff, J.H., Remy, D., Fries, E., 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environ. Pollut.* 184, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.027>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., Cachot, J., 2020. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environ. Int.* 134, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105047>
- 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. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252>
- Petosa, A.R., Jaisi, D.P., Quevedo, I.R., Elimelech, M., Tufenkji, N., 2010. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6532–6549. <https://doi.org/10.1021/es100598h>

- Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R.D., Lowry, G. V, 2007. Aggregation and Sedimentation of Aqueous Nanoscale Zerovalent Iron Dispersions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 284–290. <https://doi.org/10.1021/es061349a>
- Pikuda, O., Xu, E.G., Berk, D., Tufenkji, N., 2019. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6, 21–25. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00614>
- Pitt, J.A., Kozal, J.S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E.D., Di Giulio, R.T., 2018a. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 194, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.017>
- Pitt, J.A., Trevisan, R., Massarsky, A., Kozal, J.S., Levin, E.D., Di Giulio, R.T., 2018b. Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *Sci. Total Environ.* 643, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.186>
- PlasticsEurope, 2018. *Plastics – the Facts, Plastics – the Facts 2018*.
- Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K., 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 3, 423–428. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.111>
- Porter, A., Lyons, B.P., Galloway, T.S., Lewis, C., 2018. Role of Marine Snows in Microplastic Fate and Bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7111–7119. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01000>
- Rainieri, S., Conlledo, N., Larsen, B.K., Granby, K., Barranco, A., 2018. Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Res.* 162, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.019>
- Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., S., M., Brisson, A., 2008. Impacts of Gold Nanoparticle Exposure on Two Freshwater Species a Phytoplanktonic Alga *Cenedesmus Subspicatus* and a Benthic Bivalve. *Gold Bull.* 41, 116–126.
- Rios, L.M., Moore, C., Jones, P.R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1230–1237. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.022>
- Rizzi, F.R., Stoll, S., Senesi, N., Buffle, J., 2004. A transmission electron microscopy study of the fractal properties and aggregation processes of humic acids. *Soil Sci.* 169, 765–775. <https://doi.org/10.1097/01.ss.0000148737.88830.c1>
- 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. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 65, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011>
- Rochman, C.M., Hentschel, B.T., The, S.J., 2014a. Long-term sorption of metals is similar among plastic types: Implications for plastic debris in aquatic environments. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085433>
- Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T., Kaye, S., 2013. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: Implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1646–1654. <https://doi.org/10.1021/es303700s>
- Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014b. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Sci. Total Environ.* 493, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>
- Rosety, M., Ordóñez, F.J., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, J.M., Rosety, I., Carrasco, C., Ribelles, A., 2001. Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. *Histol. Histopathol.* 16, 839–843. <https://doi.org/10.14670/HH-16.839>
- Rossi, G., Barnoud, J., Monticelli, L., 2014. Polystyrene Nanoparticles Perturb Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 241–246. <https://doi.org/10.1021/jz402234c>
- Saito, T., Hamamoto, T., Mizuno, T., Iwatsuki, T., Tanaka, S., 2015. Comparative study of granitic and sedimentary groundwater colloids by flow-field flow fractionation coupled with ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1229–1236. <https://doi.org/10.1039/C5JA00088B>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00789-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00789-0)
- Saleh, N.B., Pfeifferle, L.D., Elimelech, M., 2010. Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2412–2418.

- Salvati, A., Aberg, C., dos Santos, T., Varela, J., Pinto, P., Lynch, I., Dawson, K.A., 2011. Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: Toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.005>
- Sean Norman, R., Stone, J.W., Gole, A., Murphy, C.J., Sabo-Attwood, T.L., 2008. Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. *Nano Lett.* 8, 302–306. <https://doi.org/10.1021/nl0727056>
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013>
- Setälä, O., Norkko, J., Lehtiniemi, M., 2016. Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Mar. Pollut. Bull.* 102, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.053>
- Shi, H., Singh, A., Kant, S., Zhu, Z., Waller, E., 2005. Integrating Habitat Status, Human Population Pressure, and Protection Status into Biodiversity Conservation Priority Setting. *Conserv. Biol.* 19, 1273–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00225.x>
- Silvestre, C., Duraccio, D., Cimmino, S., 2011. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 36, 1766–1782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003>
- Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., 2010. World Atlas of Mangroves, Wetlands. <https://doi.org/10.1007/s13157-011-0224-1>
- Srinivasa Reddy, M., Basha, S., Adimurthy, S., Ramachandraiah, G., 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 68, 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.03.018>
- Sterling, M.C., Bonner, J.S., Ernest, A.N.S., Page, C.A., Autenrieth, R.L., 2005. Application of fractal flocculation and vertical transport model to aquatic sol-sediment systems. *Water Res.* 39, 1818–1830. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.007>
- Su, F., Lu, C., 2007. Adsorption kinetics, thermodynamics and desorption of natural dissolved organic matter by multiwalled carbon nanotubes. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 42, 1543–1552.
- Sun, X., Chen, B., Li, Q., Liu, N., Xia, B., Zhu, L., Qu, K., 2018. Toxicities of polystyrene nano- and microplastics toward marine bacterium *Halomonas alkaliphila*. *Sci. Total Environ.* 642, 1378–1385. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.141>
- Suresh, L., Walz, J.Y., 1997. Direct measurement of the effect of surface roughness on the colloidal forces between a particle and flat plate. *J. Colloid Interface Sci.* 196, 177–190.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2430–2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>
- Talleg, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A., Paul-Pont, I., 2019. Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere* 225, 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077>
- Talleg, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goïc, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.020>
- Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., Saal, F.S.V., 2009. Components of plastic: Experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2079–2096. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0281>
- Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13689–13697. <https://doi.org/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. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5668–5675. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00594>
- ter Halle, A., Ladirat, L., Martignac, M., Mingotaud, A.F., Boyron, O., Perez, E., 2017. To what extent are microplastics from the open ocean weathered? *Environ. Pollut.* 227, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.051>
- 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. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2027–2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>
- Thiel, M., Hinojosa, I.A., Miranda, L., Pantoja, J.F., Rivadeneira, M.M., Vásquez, N., 2013. Anthropogenic marine debris in the coastal environment: A multi-year comparison between coastal waters and local shores. *Mar. Pollut. Bull.* 71, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.005>
- Thill, A., 2006. Agrégation des particules: structure, dynamique et simulation. Application au cas d'un écoulement stratifié: l'estuaire du Rhône.
- Thompson, R.C., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions, in: M.Bergmann, Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, pp. 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hassellöv, M., 2008. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 795–821. <https://doi.org/10.1080/02652030802007553>
- Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C.R., 2015. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Mar. Environ. Res.* 111, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007>
- Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environ. Pollut.* 182, 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.013>
- Velzeboer, I., Kwadijk, C.J.A.F., Koelmans, A.A., 2014. Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4869–4876. <https://doi.org/10.1021/es405721v>
- Verwey, E.J.W., Overbeek, J.T.G., Van Nes, K., 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer. Elsevier Publishing Company.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335. <https://doi.org/10.1021/es302332w>
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26, 12. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0012-7>
- Walz, J.Y., 1998. The effect of surface heterogeneities on colloidal forces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 74, 119–168.
- Wang, F., Bexiga, M.G., Anguissola, S., Boya, P., Simpson, J.C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2013. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale* 5, 10868–10876. <https://doi.org/10.1039/c3nr03249c>
- Wang, P., Shi, Q., Liang, H., Steurman, D.W., Stucky, G.D., Keller, A.A., 2008. Enhanced environmental mobility of carbon nanotubes in the presence of humic acid and their removal from aqueous solution. *small* 4, 2166–2170.
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>
- Watts, A.J.R., Lewis, C., Goodhead, R.M., Beckett, S.J., Moger, J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8823–8830. <https://doi.org/10.1021/es501090e>
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E.M., Kamermans, P., Koelmans, A.A., 2012. Effects of nanoplastics on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2490–2497. <https://doi.org/10.1002/etc.1984>
- Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 178, 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
- Wu, J., Jiang, R., Lin, W., Ouyang, G., 2019. Effect of salinity and humic acid on the aggregation and toxicity of polystyrene nanoplastics with different functional groups and charges. *Environ. Pollut.* 245, 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.055>
- Yu, S., Shen, M., Li, S., Fu, Y., Zhang, D., Liu, H., Liu, J., 2019. Aggregation kinetics of different surface-modified

polystyrene nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes. *Environ. Pollut.* 255, 113302. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113302>

Zhang, F., Wang, Z., Wang, S., Fang, H., Wang, D., 2019. Aquatic behavior and toxicity of polystyrene nanoplastic particles with different functional groups: Complex roles of pH, dissolved organic carbon and divalent cations. *Chemosphere* 228, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.115>

CHAPITRE 2 : Comportement de différentes nanoparticules de plastique dans des milieux salés

I Introduction

Face au constat du manque de données disponibles concernant la stabilité et le comportement des nanoplastiques dans les milieux de transition aquatiques tels que les mangroves, nous avons fait le choix d'étudier le comportement de nanoplastiques de référence dans des gradients de salinité. Ce gradient a été reproduit en miniature à l'aide de la microfluidique. Afin de se situer par rapport à la littérature existante, nous avons également effectuée des dispersions classiques en batch avec des nanosphères de polystyrène standard, couramment utilisées.

II Matériels et méthodes

II.1 Diffusion dynamique de la lumière

II.1.1 Principe de la technologie

La technologie de diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic light scattering*, DLS, aussi connu sous le nom de *photon correlation spectroscopy* : PCS) permet de déterminer le diamètre hydrodynamique de colloïdes en suspension dans un liquide en mesurant les fluctuations de la lumière diffusée par des particules agitées par mouvement Brownien.

Lord Rayleigh (1899) fut un des premiers scientifiques à avoir décrit la diffusion de la lumière pour des colloïdes de taille inférieure à la longueur d'onde du faisceau incident en fonction de leur indice de réfraction. Par la suite, Gustave Mie développa la théorie de Mie (Mie, 1908) selon laquelle l'intensité de la lumière diffusée dans toutes les directions dépend de la taille des particules, de l'indice de réfraction des particules et de l'angle du faisceau diffusé. Cette théorie est très complexe, surtout pour les particules de taille proche de la longueur d'onde du faisceau incident. Elle peut être simplifiée par l'approximation de Rayleigh-Debye concernant les particules de taille inférieure à la longueur d'onde ($< 0,1 \lambda$) pour laquelle la diffusion de lumière est isotrope. Ainsi la diffusion de lumière n'est plus dépendante de la masse, de la taille et de la forme des particules, et permet d'obtenir des solutions mathématiques en fonction de l'angle. (Hassan et al., 2015; Stetefeld et al., 2016; Wyatt, 1993).

La DLS permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des colloïdes en suspension dans un échantillon grâce à la lumière diffusée par les particules. Tout d'abord, l'échantillon doit être éclairé par un faisceau lumineux monochromatique cohérent, comme un laser, et la lumière diffusée par les particules est enregistrée par un photodétecteur à un angle θ (généralement 135° , ou 170° pour la DLS *in situ*) comme illustré sur la figure 25.

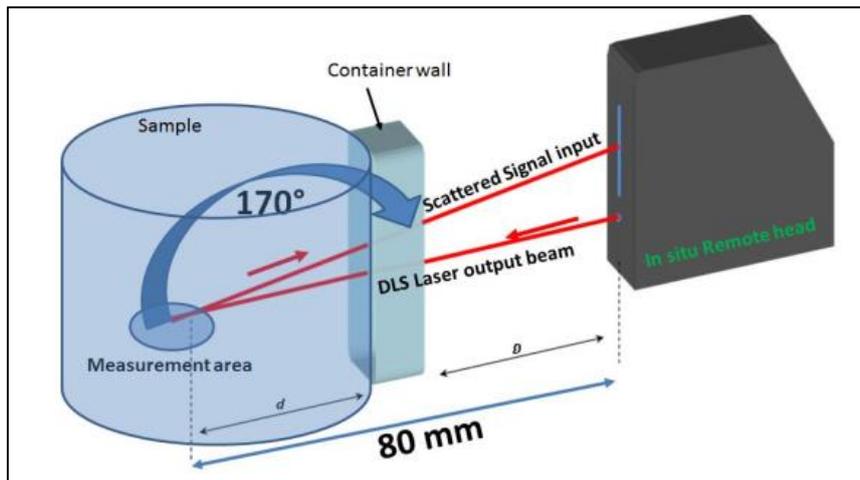


Figure 25 : Schéma de la DLS *in situ* de Cordouan Technologies. Le faisceau laser éclaire les particules en suspension dans le contenant de l'échantillon. La lumière diffusée par les particules est récoltée par un capteur à 170° du faisceau laser. (Cordouan Technologies)

L'intensité de la lumière diffusée par les particules varie au cours du temps car elles subissent des chocs avec les molécules du milieu environnant, c'est ce que l'on appelle le mouvement brownien. La vitesse de déplacement des particules dépend de leur taille, de la température, et de la viscosité du solvant. Les petites particules se déplacent rapidement et induisent des variations d'intensité plus rapide par rapport aux particules de taille plus grosse qui diffusent plus lentement comme illustré en **figure 26**. L'intensité de la lumière diffusée dépend de la taille, de la forme et de la concentration des particules, ainsi que de leur coefficient de diffusion.

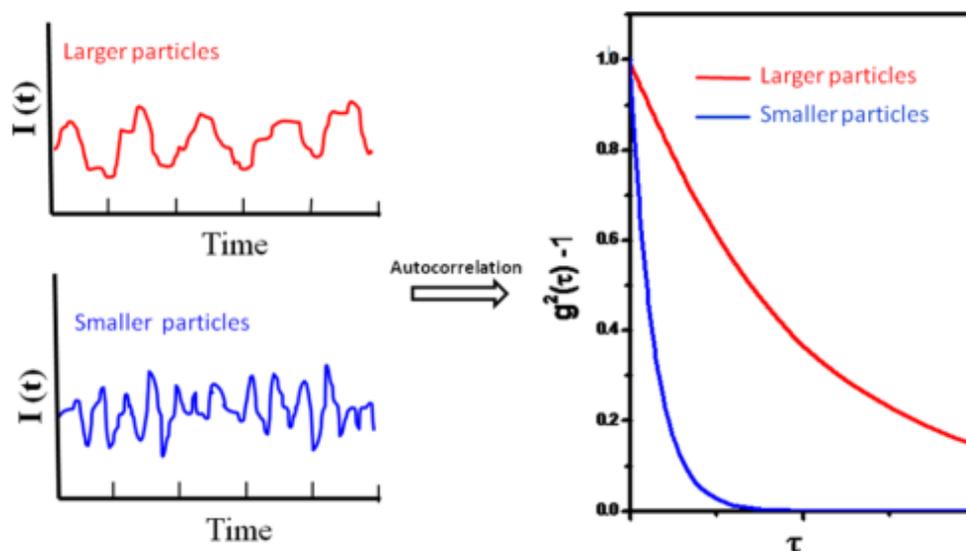


Figure 26 : Variation de l'intensité diffusée des particules en fonction de leur taille, et impact sur l'allure de la courbe d'autocorrélation (Hassan et al., 2015).

La variation d'intensité lumineuse au cours du temps ($I(t)$) peut être analysée en utilisant une courbe d'autocorrélation. Cela consiste à mesurer la variation d'intensité entre un temps t donné et $t + \tau$ (un temps très court entre la nano et la micro-seconde) et à autocorréler des valeurs à plusieurs intervalles de temps à la valeur initiale, afin de déterminer la rapidité avec laquelle

l'intensité fluctue. La fonction d'autocorrélation ($G(t)$) normalisée peut ainsi s'écrire (Friskén, 2001; Hassan et al., 2015) :

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Équation 4}$$

Ou plus simplement :

$$G(\tau) = \langle I(t) \rangle I(t+\tau) \quad \text{Équation 5}$$

Pour des particules sphériques, de distribution monomodale, soumises au mouvement brownien, la fonction d'autocorrélation décroît exponentiellement avec le retard τ , comme illustré en **figure 26**, et s'exprime selon la Relation de Siegert (Hassan et al., 2015):

$$g_2(t) = A.g_1^2(\tau) + B \quad \text{Équation 6}$$

A est une constante liée à l'instrument, et B est une constante de décalage souvent désignée comme la ligne de base. Avec

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad \text{Équation 7}$$

Γ représente la fréquence de relaxation.

Au début de la mesure, les particules ont peu diffusé donc la corrélation est forte. Au cours du temps, les particules se déplacent et la corrélation diminue. La fréquence de relaxation de la fonction d'autocorrélation est proportionnelle au coefficient de diffusion des particules D et la norme du vecteur de la lumière diffusée q, selon l'équation 8.

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{Équation 8}$$

avec
$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Équation 9}$$

avec n l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde du laser, et θ l'angle de mesure de la lumière diffusée.

Donc
$$g_2(\tau) = A.e^{-2q^2D\tau} + B \quad \text{Équation 10}$$

En utilisant la relation de Stokes-Einstein (Einstein, 1956) il est possible de déterminer le rayon hydrodynamique (R_h) des particules en tenant compte de la température T, et de la viscosité du milieu η :

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Équation 11}$$

Avec D le coefficient de diffusion des particules ($m^2 s^{-1}$), k_b la constante de Boltzmann ($1,38.10^{-23} \text{ kg.m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), et T la température (K).

Comme le rayon hydrodynamique dépend de la vitesse de déplacement de la particule dans le liquide, il ne représente pas le diamètre réel de la particule. Il dépend de la forme des particules ainsi que de l'épaisseur de la double couche électrique appelé : longueur de débye λ_D , illustrée en figure 27.

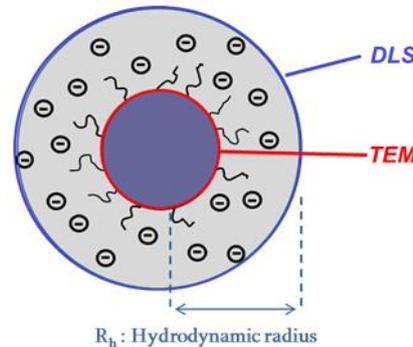


Figure 27 : Différence entre le diamètre réel d'une particule et le diamètre hydrodynamique qui dépend de l'épaisseur de la double couche électronique.

La longueur de Debye dépend de la charge de surface de la particule et de la force ionique du milieu environnant comme décrit dans l'équation 12 :

$$\lambda = \sqrt{\frac{\epsilon_d k_B T}{\sum_i q_i^2 c_i^0}} \quad \text{Équation 12}$$

avec ϵ_d la permittivité diélectrique du milieu, T la température en degré Kelvin, c_i la concentration en ions de charge q_i exprimée en ion m^{-3} , et k_B la constante de Boltzmann ($k_B=1.38E10^{-23} J K^{-1}$).

Différents algorithmes permettent d'obtenir des distributions en taille des particules à partir de la courbe d'autocorrélation. Les principales caractéristiques des deux algorithmes utilisés par Cordouan technologies Cumulant et *Sparse Bayesian Learning* (SBL) sont développés en annexe Annexe I.

II.1.1 Intérêts et limites de la technologie

La DLS est une technologie qui permet de mesurer le diamètre hydrodynamique moyen ainsi que la distribution en taille de particules submicroniques en suspension dans un liquide. Cette technique présente l'avantage de fonctionner sur large gamme de taille de particules (3-3000 nm), indépendamment de leur matière, tout en étant non invasif et non destructif. La mesure est rapide, peu coûteuse, et nécessite peu de préparation d'échantillon. L'instrument de chez Cordouan Technologies est une DLS *in situ* (Vasco flex, Figure 25), qui permet de mesurer la taille des colloïdes directement dans leur flacon, contenant, réacteur etc. Cela évite des manipulations excessives sur les échantillons et donc les risques de pollution. Mais surtout cela permet de suivre les étapes de préparation et de concentration des échantillons tout en validant la stabilité et la non-agrégation des particules.

Il y a une forte dépendance de l'intensité de lumière diffusée avec les tailles des particules. Pour les particules de diamètre inférieure à la longueur d'onde du laser $\lambda/20$, l'intensité diffusée est proportionnelle au diamètre hydrodynamique à la puissance six (Dh^6). Pour les particules de

taille supérieure, elle est proportionnelle à D_h^2 . Considérons, un échantillon composé à 50 % de nanoparticules de 3 nm et à 50% de particules de 30 nm. Le volume occupé par les particules de 30 nm sera 1000 fois plus grand que pour celles de 3 nm, mais l'intensité diffusée par les particules de 30 nm sera 10^6 fois plus importante que celles de 3 nm. De ce fait, même une petite fraction de poussière ou des particules micrométriques pourraient perturber le signal émis par des nanoparticules (Hasselov et al., 2008).

La technique permet de donner une valeur indirecte du diamètre réel des particules en calculant le diamètre hydrodynamique des particules. Les valeurs des distributions en taille sont pondérées par l'intensité diffusée, mais elles peuvent être converties mathématiquement en distribution en volume ou en nombre.

Cette technologie s'applique aux particules qui ont un mouvement brownien, uniquement. De ce fait la gamme de taille analysable par la DLS est entre quelques nanomètres à quelques micromètres.

La quantification des particules peut être possible dans le cas de particules sphériques, tant que la diffusion de la lumière évolue linéairement avec le diamètre de la particule selon la théorie de Mie (Mie, 1908). Ce diamètre varie avec l'angle de la lumière diffusée, la longueur d'onde du laser et la matière de la particule. Dans le cas de nanosphères de polystyrène avec un laser rouge (658 nm) et un angle de 135° , la quantification est possible jusqu'à un diamètre de 200 nm (Cordouan technologies).

II.1 Microfluidique

II.1.1 Intérêt de la microfluidique

La microfluidique est une technologie qui permet de miniaturiser les milieux d'études et minimiser la quantité d'échantillon nécessaire ($< \mu\text{l}$). La microfluidique est utilisée dans de nombreux domaines comme la microélectronique, l'optique (haut indices de réfraction à partir de fluides), l'étude et manipulation de cellules ou molécules unitaires. Elle est aussi utilisée en biologie cellulaire, car il est aisé de faire croître des cultures cellulaires à l'intérieur, et l'observation microscopique est facilitée. En chimie, la microfluidique est employée pour la synthèse de composés organiques, de médicaments, ou de particules, ou d'émulsions. Il est aussi possible de modéliser des micopuces pour servir de filtre. Enfin, la microfluidique est beaucoup utilisée pour faire des laboratoires miniatures (*lab-on-a-chip*) afin d'étudier les caractéristiques d'un échantillon dans un volume de quelques microlitres avec de multiples sondes (pH, électrodes, température...) connectées sur une seule puce. Ces systèmes micro-analytiques sont utilisés pour des analyses médicales (sang, urine), biologiques ou géologiques (sols) (Whitesides, 2006). D'après Abécassis et al.(2008), un gradient de salinité dans une micropuce pourrait mimer les environnement de transitions et les gradients océaniques.

Afin de reproduire les écosystèmes des mangroves nous avons conçu une micropuce dans laquelle il y a un afflux d'eau douce et d'eau salée qui sont séparées par un gradient de salinité. Dans les mangroves, les courants sont faibles et les masses d'eau se mélangent lentement, principalement par des processus de diffusion (Martin et al., 2019; Mohammed et al., 2014). Nous avons donc fait en sorte que le flux soit laminaire et que les forces de diffusion soient prépondérantes dans le processus de mélange à l'intérieur du canal de microfluidique. L'eau

douce injectée dans la micropuce contient des nanoparticules de plastique afin de mimer l'apport de nanoparticules venant des eaux de surface. Cette micropuce devrait permettre de mimer la mangrove et de recréer le trajet que les nanoparticules subissent dans le milieu naturel.

II.1.2 Fabrication des micropuces

Pour fabriquer les micropuces, un modèle est défini par lithographie souple. Une résine photorésistante (Su8 2050 Microchem) est déposée de façon uniforme sur une plaquette en silicone puis recouverte par un masque du négatif de la forme souhaitée. L'ensemble est chauffé et exposé à la lumière UV. Puis la résine est chauffée une nouvelle fois et plongée dans un bain de PGMEA (Propylène glycol méthyl éther acétate) pour dissoudre la résine qui n'a pas été exposée aux UV et le moule est terminé (Figure 28). Un polymère souple, le polydiméthylsiloxane (PDMS, Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning), est coulé sur le moule en résine et chauffé à 70°C pendant une heure afin de le solidifier (Figure 28). La plaque de PDMS est retirée du moule puis percée afin de former les trous d'entrée et de sortie du canal. Le canal est ensuite collé sur une lame de verre préalablement recouverte de PDMS, en utilisant un nettoyeur à plasma (Plasma cleaner, Harrick Plasma). Ce procédé permet de rendre la surface du verre hydrophobe. La micropuce est ensuite chauffée à 120°C pendant 2 heures afin que le PDMS récupère une surface hydrophobe.

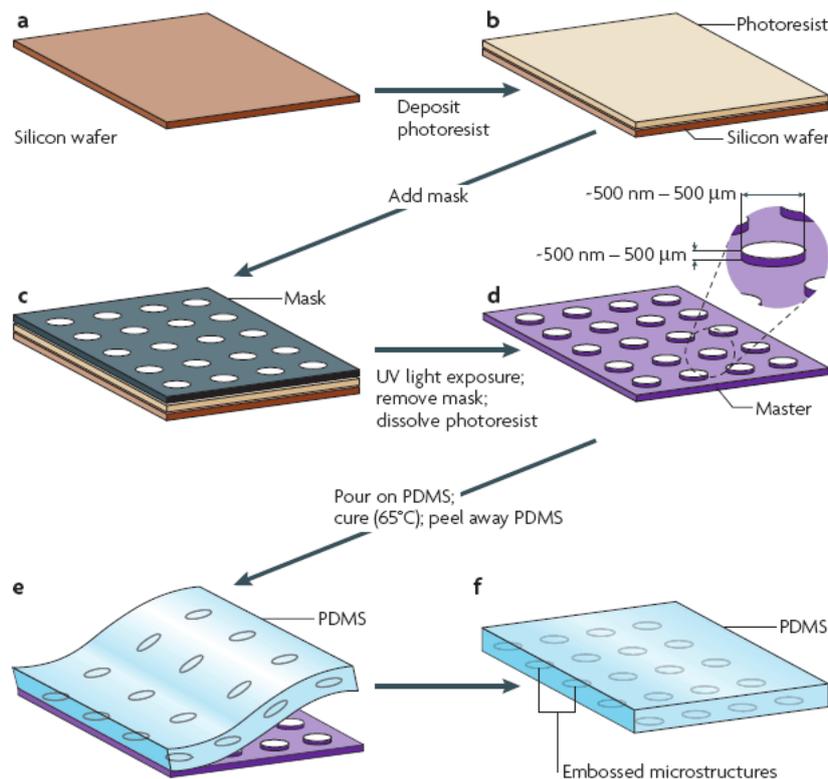


Figure 28 : Principales étapes de fabrication d'une micropuce (repris de (Weibel et al., 2007))

II.1.3 Caractéristiques du canal de microfluidique

Le canal a été conçu pour mimer le gradient de salinité dans les mangroves, c'est le même que celui utilisé dans une étude précédente de Julien Gigault (Gigault et al., 2018a). Il mesure 1,7 cm

de longueur et 800 μm de large pour 75 μm d'épaisseur. Il comporte deux entrées et deux sorties (Aout et Bout) en forme de Y de 5 mm de long et 200 μm de large (Figure 29).

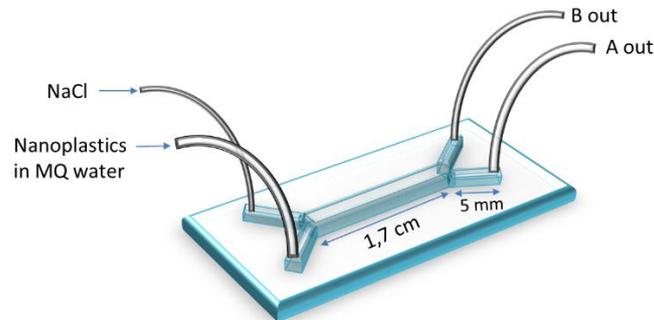


Figure 29 : Schéma du micro-canal utilisé pour mimer le gradient de salinité d'une mangrove

Pour recréer le gradient de salinité une dispersion de nanoplastiques dispersés dans de l'eau ultra-pure est injectée dans une des entrées du canal. Dans l'autre on injecte une solution de NaCl à la concentration de 500 mM (ou 30g L⁻¹), une concentration proche de celle de l'eau de mer. Le débit est choisi afin d'avoir un mouvement des fluides laminaires et que le mélange des fluides soit soumis uniquement aux forces de diffusion. Pour cela le nombre de Reynold \mathcal{R} doit être petit, afin que les forces de viscosité dominent les forces d'inertie. À ce moment-là les flux seront linéaires et sans turbulences. Il est calculé selon la formule suivante :

$$\mathcal{R} = \frac{\rho U h}{\eta} \quad \text{Équation 13}$$

avec ρ la densité du fluide, U le débit du fluide, h la largeur du micro-canal et η la viscosité de cisaillement du fluide (Squires and Quake, 2005; Stone et al., 2004).

Le nombre de Péclet \mathcal{P} doit être grand afin que le mélange des fluides se fasse par diffusion plutôt que par convection (Squires and Quake, 2005; Stone et al., 2004). Ce nombre dépend du débit U , de la diffusion moléculaire D_m , et de la section/largeur du micro-canal h (Équation 14).

$$\mathcal{P} = \frac{U h}{D_m} \quad \text{Équation 14}$$

Un débit de 2 ml h⁻¹ permet d'avoir un nombre de Péclet supérieur à 10⁴ et un nombre de Reynold compris entre 0,02 et 0,04. Ce débit est maintenu constant par l'utilisation d'un pousse seringue (KDS 200, KD Scientific).

Le gradient de salinité a été caractérisé dans la micropuce pour un débit de 2 ml h⁻¹ et est présenté en **Figure 30**. En sortie de canal la salinité est de 30 mmol L⁻¹ dans la sortie A et de 460 mmol L⁻¹ dans la sortie B (**Figure 29**)

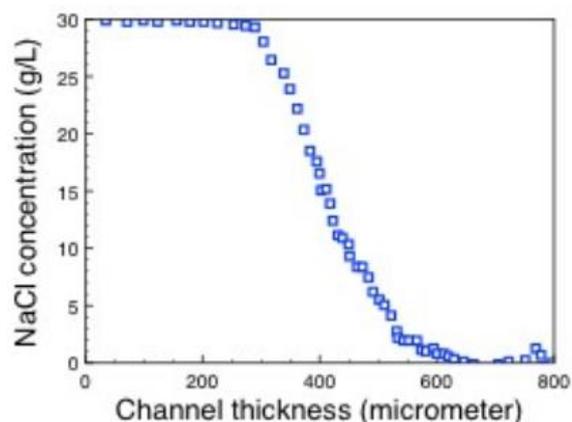


Figure 30 : Gradient de salinité en coupe transversale du canal (d'après Gigault et al., 2018a)

II.2 Nanoparticules de plastiques

Toutes les nanoparticules de plastiques présentées dans cette partie ont été caractérisées selon les mêmes procédés. La distribution en taille de particules a été mesurée avec une DLS *in situ* (Vasco Flex, Cordouan Technologies, Pessac, France), et la forme des particules a été visualisée en utilisant un microscope électronique à transmission (TEM) de paillasse à faible voltage (LVEM5, Delong Instrument, Brno, République Tchèque). Le potentiel zêta a également été mesuré afin de connaître la charge de surface (zetamètre Wallis, Cordouan Technologies, Pessac, France). Enfin, la concentration en particules a été évaluée en mesurant la quantité totale de carbone (TOC, Shimadzu, Tokyo, Japan)

II.2.1 Latex de polystyrène

Les nanosphères de polystyrène latex (PSL) sont couramment utilisées pour étudier le comportement et la toxicité des nanoparticules de plastique dans l'environnement. Nous avons donc utilisé des particules de ce type en tant que référence, pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux disponibles dans la littérature.

Nous avons utilisé plusieurs types de latex dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des PS-latex utilisés

Nanoparticule	Taille nominale (TEM) (nm)	Z-average/PDI (nm)	Potentiel ζ (mV) à pH 7	Taux d'oxydation (mmol de sites réactifs g^{-1})	Type de fonctions de surfaces quantifiées	Surfactants
PSL	200	221/ 0,048	-30 \pm 2,5	Non mesurée	Aucune	Composition Inconnue
PSL-COOH	200	217/ 0,048	-38,6 \pm 2,23	0,342 \pm 3.10 ⁻³	Tous sites déprotonable	Composition Inconnue
PSL-COOH free soap	345	433/ 0,003	-42 \pm 2	0,92 \pm 01	-COOH	Aucun

Des nanosphères de polystyrène latex standards (PSL) certifiées par le National Institute of Standard and Technology, NIST) de différentes tailles (20 nm, 100 nm, 200 nm) et contenant des surfactants dont la composition n'est pas révélée par le fabricant. Elles ont été utilisées comme référence parmi les PSL (Thermo Fisher Scientific, IllkirchGraffenstaden, France). Nous avons également utilisé des PSL avec des fonctions carboxylate (PSL-COOH), de 200 nm de diamètre, contenant des surfactants dont la composition n'est également pas révélée par le fabricant (Polysciences Europe GmbH, Germany). Le taux d'oxydation a été évalué par la par titration ($0,342 \pm 3.10^{-3}$ mmol de sites réactifs g^{-1}) (Blancho, n.d. en préparation). Nous avons comparé ces particules avec des PSL contenant une grande quantité de fonction $-COOH$, synthétisés sans surfactant par le laboratoire IPREM (PSL-COOH free soap, PS18 dans l'article Pessoni et al., 2019). Ces PSL mesurent 345 nm de diamètre (Figure 31) et la quantité de fonction $-COOH$ de surface a été mesurée par titration ($0,92 \pm 01$ mmol de $-COOH$ g^{-1}).

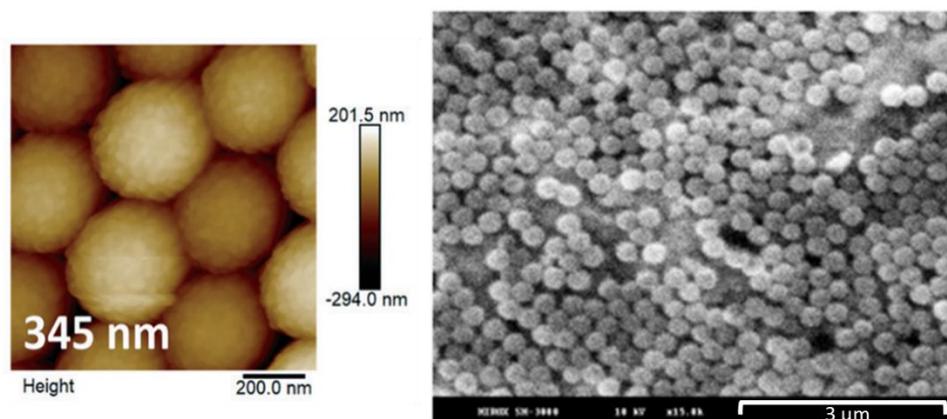


Figure 31 : Images SEM et AFM des PSL-COOH synthétisées sans surfactant d'après Pessoni et al. (2019).

II.2.2 Nanoparticules de polystyrène vieilles

Afin de se rapprocher des nanoplastiques environnementaux, des nanoparticules de polystyrènes vieilles mécaniquement (PS-ref) ont été produites selon le protocole mis au point par El Hadri et al. (2020). Des granulés de polystyrène incolores (Goodfellow, Lille, France, Figure 32) sont préalablement broyés grossièrement à l'aide d'un broyeur à lame. Ensuite, le broyat est transformé en fine poudre à l'aide d'un broyeur planétaire à bille (Pulverisette 7, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany). Les bols ainsi que les billes sont composés d'oxyde de zirconium afin de limiter la contamination des échantillons. Le processus de broyage comporte 4 étapes composées de 10 cycles de 3 minutes de broyages et 4 minutes de pause, afin de limiter l'échauffement de l'échantillon. Le broyage était effectué à sec pour la première étape puis avec ajout d'éthanol absolu, en tant qu'agent dispersant, pour les autres étapes. La poudre est ensuite séchée par lyophilisation afin de retirer toutes traces d'éthanol résiduel qui biaiserait la mesure de la concentration en plastique lors de la mesure de la concentration totale en carbone organique (TOC).



Figure 32 : Granulés de polystyrène avant broyage, avec un diamètre d'environ 5 mm.

Afin d'obtenir une dispersion de nanoparticules de plastique, la poudre est dispersée dans de l'eau ultra pure ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Millipore water purification system, Merck, Darmstadt, Germany), grâce à un bain à ultrason, puis filtrée avec un filtre en acétate de cellulose (VWR, Briare, France). Le filtrat est ensuite remis en contact avec la poudre puis soumis au bain à ultrason et filtré une seconde fois. Cette étape est répétée autant de fois que nécessaire afin d'obtenir une concentration en particule satisfaisante (jugée à l'opacité de la dispersion, correspondant à une concentration supérieure à 50 ppm de TOC). Il faut noter que l'étape de filtration est cruciale pour obtenir des particules inférieures au micromètre. Les particules de plastique ayant une affinité particulière avec les membranes de filtration, elles peuvent être piégées à la surface de la membrane. Pour limiter les pertes, les pores du filtre sont volontairement supérieurs à la classe de taille désirée (5-6 μm).

Les principales caractéristiques des PS-ref sont résumées dans le Tableau 4. La forme des nanoparticules est découpée et aléatoire comme le montrent les images TEM en **Figure 33**. On peut observer deux types de particules qui se distinguent par un contraste différent. Les particules noires bien contrastées et craquelées et des particules anisotropes grises. Le faible contraste de la deuxième population pourrait être attribué à un détachement de la surface des microparticules (contrairement à une cassure).

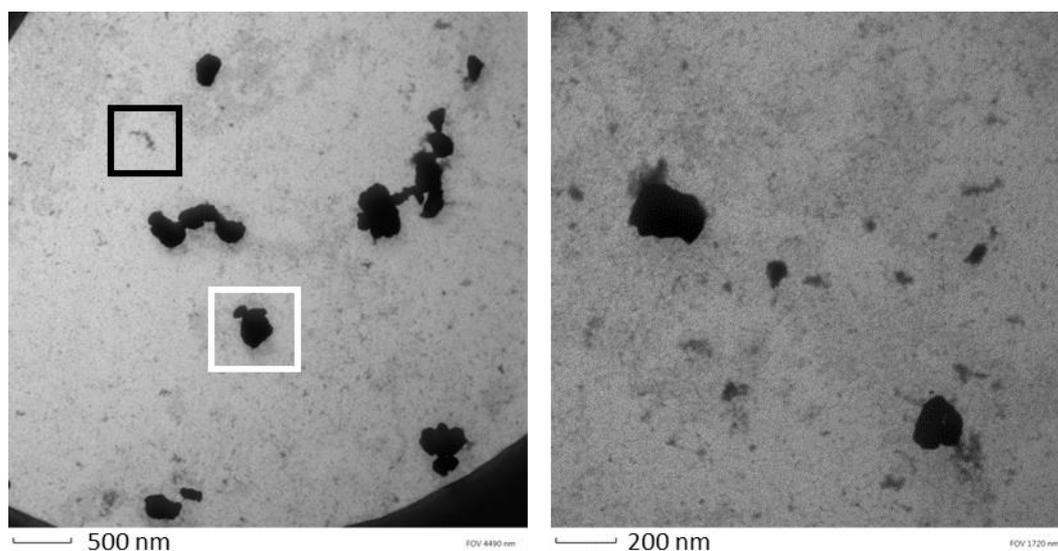


Figure 33 : Images TEM de PS-ref à différents grossissements. Les cadres noirs et blanc indiquent des particules de différentes densités.

La distribution en taille des particules obtenues est relativement similaire entre les différents lots. Elle montre deux populations de taille entre 100-200 nm et 400-550 nm (**Figure 34**) avec

un Z-average moyen de 354 ± 30 nm avec un PDI moyen de 0,19. Lorsque l'on trace la distribution de taille en nombre, on constate que la majorité des particules se trouvent en dessous de 200 nm (**Figure 34**).

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des PS-ref et des NPG

Nanoparticule	Z-average (nm)/ PDI	Potentiel ζ (mV) à pH 7	Oxydation de surface (mmol de sites réactifs g^{-1})
PS-ref	354 ± 30 nm / 0,19	-44 ± 2	$0,076 \pm 7.10^{-4}$
NPG	361 ± 40 nm / 0,21	$-30,2 \pm 1,1$	$0,3825 \pm 0,01^*$

*valeur obtenue pour des nanoparticules décrochées par ultrason de la surface de fragment de plastiques de Guadeloupe dont la matière organique a été préalablement retirée (Blanco, n.d.)

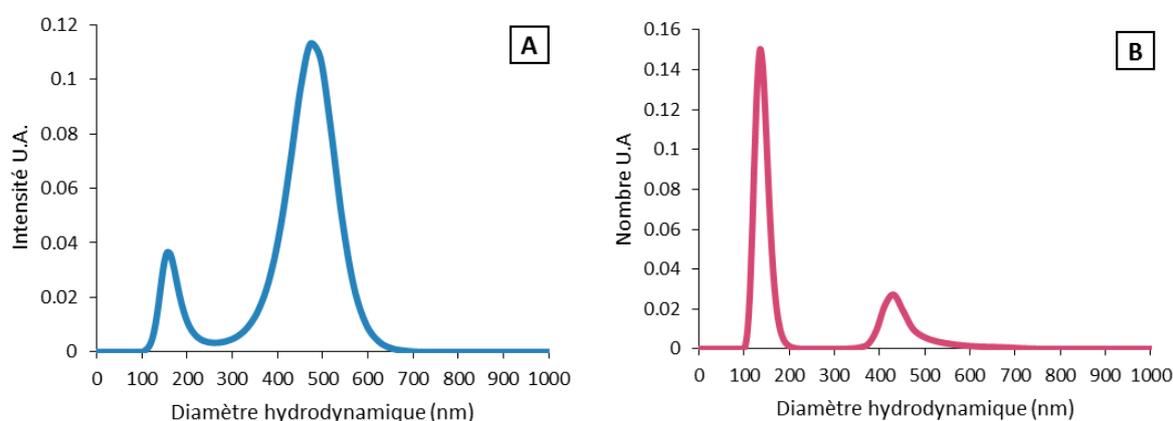


Figure 34 : Distribution en taille des PS-ref selon l'algorithme SBL (DLS in situ). A: pondéré par l'intensité, B: en nombre.

Le potentiel zêta de la dispersion est très négatif (-44 ± 2 mV, pour un pH natif de 6,4) ce qui indique que les nanoparticules sont électriquement stables. La dispersion reste stable pendant au moins 7 jours à température ambiante ou à $4^{\circ}C$ (Z-average constant). Le taux d'oxydation a été évalué par la par titration (mesure du nombre de sites réactifs) (Blanco, n.d. en préparation), et montre une faible quantité de sites réactifs ($0,076 \pm 7,10^{-4}$ mmol de sites réactifs g^{-1}) par rapport au PSL-COOH et aux NPG.

II.2.3 Nanoparticules produites à partir de plastiques environnementaux

Des plastiques secondaires vieillis dans l'environnement ont été récoltés en 2016, sur les plages de Guadeloupe (Le Moule, $16^{\circ}21'06''N$ $61^{\circ}23'09''W$) (Figure 35). Cette île des caraïbes est connue pour être exposée au gyre Atlantique nord, zone d'accumulation de déchets plastiques (Eriksen et al., 2019). Selon la mesure faite avec un FTIR (PP) (Nicolet iS50, Thermofischer, Villebon-sur-Yvette, France) le mélange de plastiques était principalement composé de polyéthylène (PE) et de polypropylène (PP) déjà vieillis (oxydés) (El Hadri et al., 2020). Ces morceaux de plastique ont été broyés en poudre puis dispersés dans de l'eau ultra-pure, selon le même protocole que les granulés de polystyrène (section II.2.2). Les morceaux de plastique n'ont pas été nettoyés avant broyage, afin de garder toutes les substances déposées et adsorbées en surface, pour être plus proches de nanoparticules environnementales. Cependant la quantité

de matière organique en surface des nanoparticules était relativement faible (Davranche et al., 2019). La dispersion de nanoparticules est nommée NPG.



Figure 35 : Plastiques secondaires récoltés sur la plage de Guadeloupe (El Hadri et al., 2020)

Les images en microscopie à transmission montrent que les NPGs ont une forme hétérogène et découpée, similaire à celle de PS-ref (Figure 36). Il y a également deux mêmes types de particules : des noires bien contrastées et craquelées et des particules anisotropes grises.

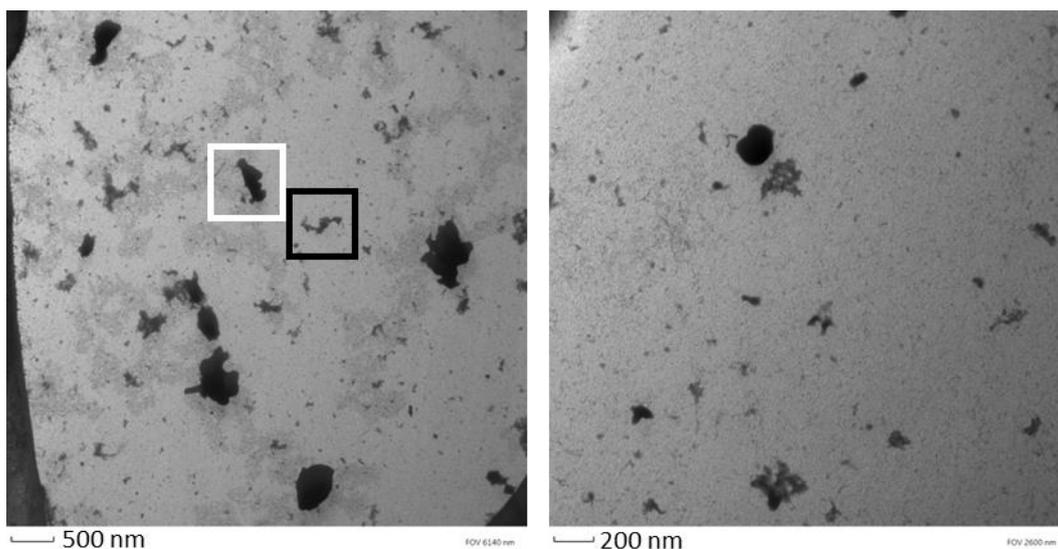


Figure 36 : Images TEM des NPG à différents grossissements. Les cadres noirs et blanc indiquent des particules de différentes densités.

La distribution en taille des nanoparticules est relativement similaire entre les différents lots de préparation. Elle est composée de deux à trois populations. La plus petite population autour des 200nm est présente dans chaque lot. Puis il y a une population intermédiaire autour des 400 nm ou autour des 700nm. Enfin il peut arriver qu'il y ait une population plus grosse autour des 900 nm (Figure 37). Le Z-average moyen de de 361 ± 40 nm (Figure 37). La dispersion a un potentiel zêta de $-30,2 \pm 1,1$ mV (pour un pH natif de 7), ce qui correspond selon la théorie, à une bonne stabilité des particules. La dispersion de NPG est toutefois moins stable que la dispersion de PS-ref, et peut se conserver 24 à 48 heures à 4°C (pour éviter un éventuel développement microbien).

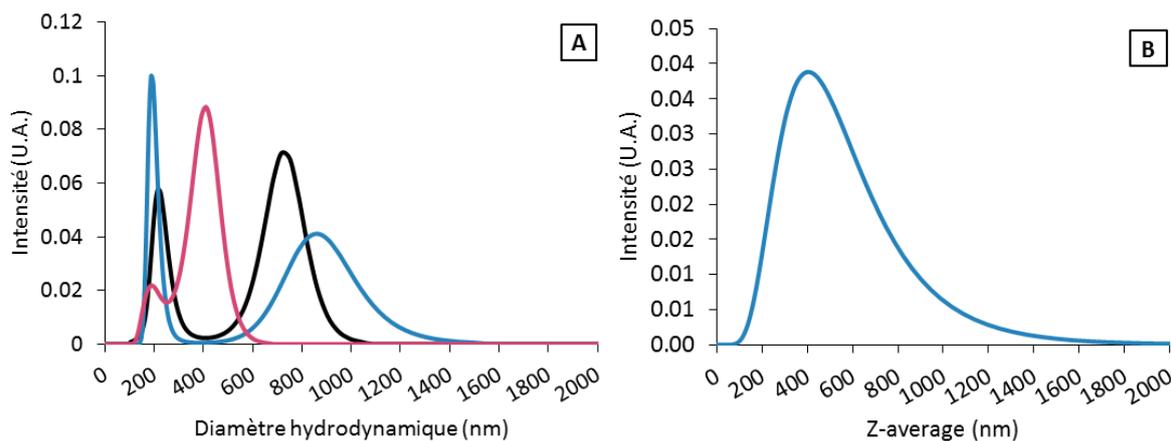


Figure 37: A : Distribution en taille de plusieurs lots de NPG (algorithme SBL). B : Z-average des NPG (algorithme Cumulant).

II.2.4 Remarques sur les caractéristiques des PS-ref et les NPG

D'après les images TEM on observe deux populations de nanoparticules dans les préparations de PS-ref et NPG. Dans les deux cas, il y a des particules découpées très contrastées et des particules anisotropes peu contrastées. Ces dernières pourraient être la surface pelée de la microparticule. D'autre part les formes hétérogènes des PS-ref et des NPG ressemble fortement aux formes des nanoparticules obtenues pas dégradations UV par Gigault et al., 2018, 2016), ce qui confirme que le protocole de fabrication permet de former des particules vieilles.

Le protocole de fabrication des PS-ref et des PSL permet de produire des nanoparticules stables en solution ce qui est avantageux compte tenu de l'absence de surfactant. Il permet également d'obtenir des distributions en taille similaires entre les différents lots et qui sont dans la gamme du nanomètre.

II.2.5 Similitudes entre les nanoparticules de plastique utilisées et les nanoplastiques environnementaux

Les nanoparticules vieilles produites pour cette étude comportent de nombreux avantages par rapport au nanosphères de latex. Tout d'abord, parce que les NPG et les PS-ref ont des formes et des distributions en taille proches des nanoplastiques détectés et caractérisés dans l'océan Atlantique Nord contrairement aux PSL qui sont sphériques, monodispersés et peuvent contenir des additifs (surfactant, biocides) (Pikuda et al., 2019). Nous avons classé ces différents modèles en terme de représentativité environnementale ainsi :

NPG > PS-ref > PSL-COOH free soap > PSL-COOH > PSL.

Les NPG sont issus directement d'un mélange de plastiques prélevés dans l'environnement, ils ont été vieillis *in situ* (UV, frottements) et ont le plus fort taux d'oxydation de surface. Ils peuvent aussi avoir de la matière organique et des polluants adsorbés à leur surface. Les PS-ref sont également oxydés en surface mais en moindre mesure car l'oxydation provient des radicaux libres créés lors de la rupture des liaisons covalentes par le broyage mécanique. Les PS-ref possèdent l'avantage d'être fabriqués à partir de granules de polystyrènes neuf propre et incolores. Concernant les latex de polystyrène, les fonctions carboxylatées représentent un taux d'oxydation supérieur aux PSL non fonctionnalisés, et les PSL-COOH free soap ont un taux de

fonction $-COOH$ important et quantifié. L'absence de surfactant et de bactéricide dans ces derniers, les rend également intéressants par rapport à l'influence des tensio-actifs sur les effets toxicologiques (Pikuda et al., 2019). Enfin les PSL ne sont pas oxydés en surface et comportent un mélange de surfactant et d'additifs inconnu.

II.1 Démarche expérimentale Batch et microfluidique

Le but de cette étude est de caractériser et de comprendre le comportement d'agrégation des nanoplastiques dans les systèmes aquatiques saumâtres comme les mangroves. Pour cela nous avons miniaturisé et simplifié les gradients de salinité que l'on peut trouver dans les mangroves à l'intérieur d'une puce de microfluidique. L'eau provenant des rivières est assimilée à de l'eau ultrapure et l'eau provenant de l'océan est réduite à une solution de NaCl à 513 mM (30g L^{-1}). Ces valeurs ont été choisies en accord avec les salinités mesurées dans la mangrove de Guadeloupe représentées en figure 38.

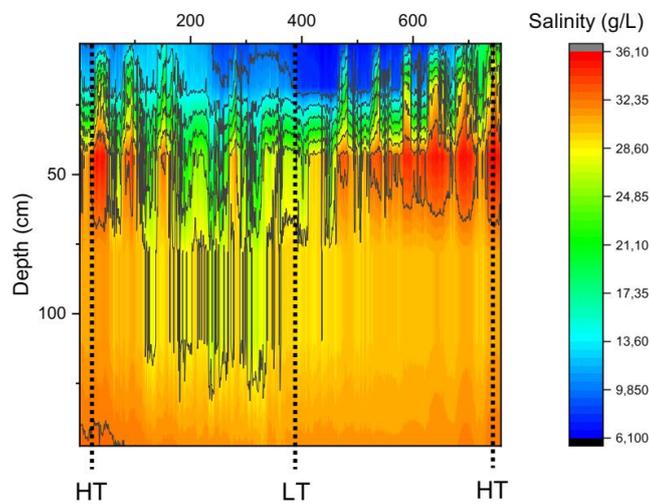


Figure 38 : profil de salinité d'une mangrove de Guadeloupe en fonction de la profondeur et des marées (marée haute HT, marée basse LT)

Les nanoplastiques sont remplacés par des nanoparticules de plastiques vieilles en laboratoire qui sont représentatives des nanoplastiques environnementaux. Les mouvements de fluides sont réduits à des flux laminaires, où seules les forces de diffusion agissent sur le mélange des fluides et le transport des nanoparticules. Le comportement d'agrégation dans le gradient de salinité sera comparé à des expériences classiques de dispersion de nanoparticules dans des solutions salines, que nous appellerons : « dispersion en batch ». Cela consiste à injecter une solution de NaCl concentrée dans des nanoparticules dispersées dans de l'eau ultrapure, afin d'obtenir une concentration en sel finale de 513 mM (30g L^{-1}). Puis l'ensemble est mélangé par agitation manuelle (Figure 39).

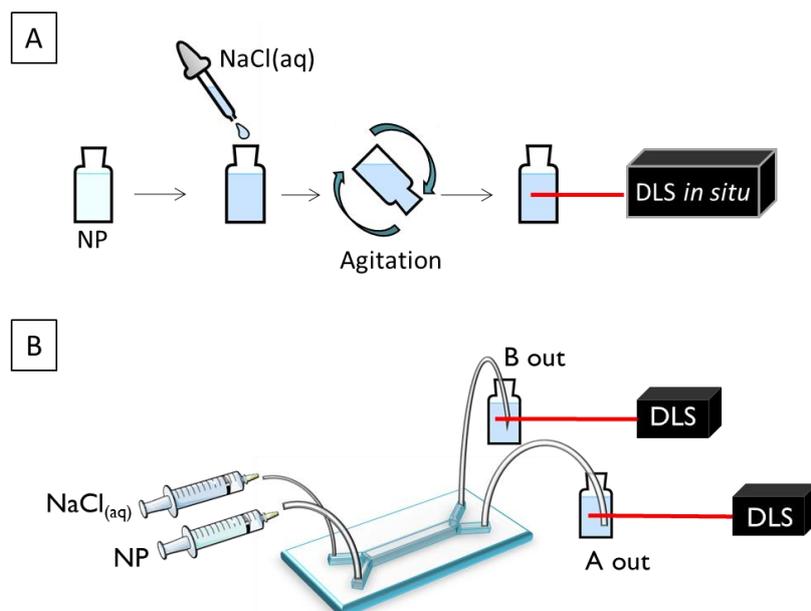


Figure 39: Schéma des expérimentations : A) en Batch B) en microfluidique

Le comportement de plusieurs types de nanoparticules de plastiques sera comparé, en fonction de leur similitude avec les nanoplastiques environnementaux : NPG > PS-ref > PSL-COOH free soap > PSL-COOH > PSL, avec les NPG les plus proches des nanoplastiques et les PSL les plus éloignés (section II.2.5).

Afin de se rapprocher des conditions d'exposition des organismes lors des expérimentations écotoxicologiques, le comportement des NP a aussi été évalué dans les milieux d'exposition. Il s'agit de l'eau de mer artificielle pour les huîtres de mangroves, du milieu de culture Dauta pour les microalgues d'eau douce *Scenedesmus* sp et du milieu de culture F/2 pour les microalgues *Isochrysis* sp et *Thalassiosira* sp.

Afin d'évaluer le comportement d'agrégation des nanoparticules, l'évolution du diamètre hydrodynamique des particules est mesuré au cours du temps avec une DLS *in situ* ((Vasco Flex, Cordouan Technologies, Pessac, France) pendant 1h30 après le mélange des fluides (batch) ou en collectant le liquide en sortie de la micropuce.

III Résultats

III.1 Comportement de nanoplastiques dans un gradient de salinité : approche expérimentale utilisant la microfluidique

Article en cours de préparation

Behavior of nanoplastics in relevant salinity gradient: experimental approach using lab-on-a-chip

Zélie Venel^{1,3,6}, Hervé Tabuteau^{2*}, Alice Pradel¹, Pierre-Yves Pascal, Hind El Hadri^{4,6}, Magalie Baudrimont³, Julien Gigault^{1,5*}

1 Géosciences Rennes, CNRS/Université de Rennes 1, Rennes, France

2 IPR, CNRS/Université de Rennes 1, Rennes, France

3 Université de Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Bordeaux, France

4 Université des Antilles et de la Guyane

5 IPREM, CNRS/Université de Pau, Pau, France

6 TAKUVIK, CNRS/Université Laval, Québec, Canada

7 Cordouan Technologies, Pessac, France

Abstract :

In the present work, we demonstrate the importance of the dynamic of environmental conditions to investigate the colloidal behavior of nanoplastics. Since the recent highlight of nanoplastics in environmental systems, a large attention have been recently devoted to determine their impact and fate. Most of the studies used models and experimental approach that are not representative to the natural media and therefore induce misinterpretation of effect and behavior of nanoplastics. Here, we developed a microfluidic-based experiment to reproduce natural ionic strength gradient where nanoplastics are supposed to pass through. By comparing three models of nanoplastics with different degrees of environmental relevance, we demonstrated that the expected aggregation mechanism as a function of ionic strength is not similar when the dynamics are taken into account. In closed and static system, Diffusion Limited Aggregation and Reaction Limited Aggregation are the main mechanisms of particle aggregation, while in dynamic condition these modes cannot explain the behavior of nanoparticles. While a fraction of the nanoplastics aggregates to form microplastics, a second fraction remain stable in high ionic strength condition in contrast to the static experiments. These results raised up several environmental implications that are summarized in the present paper.

Key words : Nanoplastics; aggregation; gradient; microfluidics; environmental fate

Environment significance statement.

Up to now, the fate, behavior and impact of nanoplastics in the environment were investigated in laboratory by designing experimental set-up without considering the importance of nanoplastics physical and chemical heterogeneities as well as the dynamic of environmental features like flow. And yet, the nanoplastics fate and behavior assessment is crucial to better evaluate the (eco)toxicity and to develop mitigation plan for this new class of emerging contaminant. Here by developing lab-on-chip experiments and the use of highly representative nanoplastics models we demonstrate new aggregation mechanisms that are not expected in

natural media. Our results raised up several environmental implication such as analytical, ecotoxicological, and environmental engineering, for addressing the fate and impact of nanoplastics.

INTRODUCTION

With the global oceanic circulation, a considerable quantity of microplastics end-up and accumulate in the gigantic oceanic vortex (Law et al., 2010). However, despite the recent proof of their presence in environmental systems, there is no knowledge about the source, fate and behavior of nanoplastics (NpT) compared to the microplastics (Ter Halle et al., 2017). This new class of nanoparticles, with a size between 1 and 1000 nm, are directly coming from the degradation of the plastic debris present in the environment (ocean, river, soil, etc.) (Gigault et al., 2018c; Hartmann et al., 2019), starts to retain large attention about scientific and politics, especially regarding their possible impact on organisms. And yet to better evaluate this impact, to develop remediation and monitoring strategies, there is a large pressure to acquire data on nanoplastics fate in natural media (Albert A. Koelmans et al., 2015; Wan et al., 2018).

As other colloids materials, one of the main routes of NpTs involved the land-sea continuum interfaces. Indeed, this latter interface is one of most exposed to anthropogenic pressure and the river is known to be one of the principal source of plastic debris in marine system (Schmidt et al., 2017). Due to the lack of methods to track and identify nanoplastics in real environments, fate and behavior of NpTs can be essentially predicted by developing experimental studies. More specifically concerning land-sea continuum where the ionic strength is one of the most important parameter with pH. The typical experiment consists to add an homogeneous and known concentration of NaCl or CaCl₂, to an aqueous dispersion containing spherical polystyrene nanoparticles (Mao et al., 2020; Shams et al., 2020; Tallec et al., 2019). By measuring the size evolution of the nanoparticles according to time, indication on the stability/aggregation in aqueous media can be obtained. Based on this value, a rapid hypothesis on the possible fate of NpTs or on remediation strategy are generally proposed.

All these studies and experimental approaches used spherical nanoparticles of polystyrene that are directly synthesized at the nanoscale by emulsion process. Such process involved the use of surfactants and other co-polymer to enhance the aqueous stability and to design specific surface functionalization (carboxylate COOH, sulfate SO₄, amine NH₃, etc.) (Koelmans, 2019; Pessoni et al., 2019). These spherical models can also be doped by metals to facilitate their detection in natural and complex media (Mitrano et al., 2019). Indeed, ecotoxicological studies used these spherical nanoparticles polystyrene to estimate the impact of nanoplastics. While the size, shape and surface of this model are perfectly controlled and characterized, some knowledge is beginning to be acquired about the influence of the size and/or surface characteristics of nanoplastics on the effects they can have on organisms (Ferreira et al., 2019).

However, the major limitation of these studies is the lack of environmental representativeness mainly due to nanoplastics models used and to the experimental set-up. Indeed, concerning nanoplastics models, we recently demonstrated that the size and shape have a huge influence on their transportation mechanisms in porous media. Based on our observation in environmental

media (Gigault et al., 2016; Ter Halle et al., 2017), NPs are highly polydisperse and heterogenous in shape with size generally ranging from 1 to 600 nm in diameter (Hartmann et al., 2019). Then, the classical experimental approach using closed and static system does not take in account the spatial and temporal dynamics of the natural features. Most of the system land-sea continuum, where NPs are supposed to pass through, are characterized by large salinity gradient and flows. These two parameters were never considered to evaluate the fate and behavior of NPs in relevant environmental media. In the same way, concerning the ecotoxicological studies, the injection of NPs in exposure media was realized without taking care about possible transformation of the particles. We recently demonstrated that for engineered nanoparticles, the transport to the salinity gradient gives contradictory result to the classical experimental set-up (Gigault et al., 2018b). Based on this previous work, the objective of the present one is to investigate and demonstrate the influence of the dynamic (flow and salinity gradient) on nanoplastics fate and behavior in representative media. To do so, we develop a microfluidic approach to reconstruct a representative salinity gradient and we use nanoplastics models. Our results demonstrate for the first time the importance of the nanoplastics shape in the transportation mechanisms through the salinity gradient. While particle aggregation is expected to occur when the ionic strength increase, it is demonstrated that, in dynamic condition, two mechanisms occur: an irreversible large aggregation and a separation of the aggregates population. While one population is deposited on the microfluidic device due to the buoyancy of microscale aggregate, the second one remains stable in the microfluidic device outlets. Such separation is constant whatever the initial concentration of nanoplastics coming in the microfluidic device. Our results show a new and unexpected behavior of nanoplastics and nanoparticles in the salinity gradient.

MATERIALS AND METHODS

Chemical and sample preparation

Deionized water (DI) (Millipore, 18,2 m Ω , TOC 3 -5 ppb) was used for all sample preparations and dilutions. Sodium Chloride (NaCl) powder was purchased from Sigma-Aldrich. Different nanoplastics models were used in this study and are summarized in the table 1 below. Non carboxylated and carboxylated polystyrene latex spheres of 200 nm (PSL and PSL-COOH) were purchased from ThermoScientific (NIST traceable nanosphere size standards) and Polysciences© (Polybead® Carboxylate Microspheres 0.20 μ m). These particles contain additives for stabilizing purposes that were not determined in the present study. Finally, a nanoplastic model was produced in order to be more environmentally representative with asymmetrical and irregular shapes and similar formation pathway according to the method previously described (El Hadri et al., 2020).

Table 1: Nanoplastics physical and chemical characteristics

Nanoplastics models acronym	PSL	PSL-COOH	PS-NPs
Nominal size	200	200	
Z-average (d_{zH} , nm) ^a	221/ 0,048	217/ 0,048	354±30
Distribution	Monodispersed	Monodispersed	Polydispersed
Zeta potential at pH 7 (mV) in 5mM of NaCl	-38	-40	-32
Shape	Spherical	Spherical	Asymmetric (heterogeneous)
Surface	Uncharged (micellar stabilization)	Carboxylated (COOH)	Slowly carboxylated
Purchaser	Thermo Scientific	PolyScience	Home-made

^a Determined with the Cumulant algorithm.

Size and charge characterization

The zeta potential of the particles was assessed using a Wallis zetameter (Cordouan Technologies, Pessac, France). At pH 7 in at 5.10^{-3} mol L⁻¹ of NaCl. The electrophoretic mobility of the colloidal particles was converted into a zeta potential by using Smoluchowski's formula.

Hydrodynamic diameters were determined by an *in situ* Dynamic Light Scattering (DLS) using a Vasco-Flex model of particle size analyzer (Cordouan Technologies). Each DLS measurement corresponds to an average of six measurements of 60 seconds each. Each sample was assigned a Z-average hydrodynamic diameter (d_{zH}) using the Cumulant algorithm. Additionally, Sparse Bayesian Learning (SBL) algorithm was used to obtain the size distribution. All results presented have less than 1% difference between all points of the raw and fitted autocorrelation function (ACF).

Size of aggregates deposited on the top of the microfluidic devices (MD) was also evaluated using scanning electronic microscopy (TM3030 Plus, Hitachi). To this end, the MD is thoroughly rinsed with ultrapure water with a flow rate of 2mL h⁻¹ and then the MD is separated from its glass support and metallized with gold. Proportion and density of aggregates are calculated by counting particles and divided by magnifying value. Particles inside aggregates are also counted and the aggregate sizes are measured using Image J software.

Mangrove observation and analysis

The salinity and temperature profile of the Mangrove water column were measured using Ijinus *in situ* conductimeters (Quimperlé, France) coupled to a wireless. Briefly, eight conductimeter sensors were placed along a z-axis arm of 1.5m long and fixed to a boat. Then, boat was settled in different area and the salinity and temperature were measured very 30 seconds and directly transmitted to a recorder placed on the boat. Mangrove swamp current was analyzed using a current meter (homemade setup). Water at different depth was collected and Cu(II) was analyzed after preliminar sequential ultrafiltration using Amicon cell

(Millipore, France). Cu was analyzed by Inductively Coupled-Plasma Mass Spectrometry (7700x, Agilent Technologies, France).

Transport in the microfluidic devices

As previously described, a microfluidic device (MD) was developed to mimic a salinity gradient (Gigault et al., 2018b). The working principle is summarized in the Figure 40 below. Two inlet and outlet arms of 5 mm long and 200 μm wide are connected to a 1.7 cm long and 800 μm wide channel. Height of arms and channels is 75 μm . Aqueous dispersions of plastic nanoparticles and NaCl solution were together injected in two different inlets of the microfluidic device using syringe pumps (KDS 200 scientific) at the same flow rate (from 0.5 to 10 mL h^{-1}). According to the MD dimensions and the flow rates investigated, we work at low Reynold number ($0.02 < \text{Re} < 0.4$) and with Péclet number higher than 10^4 , meaning that particles do not diffuse around the fluid streamlines more than few micrometers transverse to the flow direction over the whole length of the MD. Liquids flow through 20 cm tubing before being collected in two vials connected to each outlet, during one hour. In the following, the flow rate is stopped and we monitor the evolution of particle Z-average hydrodynamic diameter (d_{zH}) over 100 min using the *in-situ* DLS probe (Figure 40B). MD is first saturated with pure water, then filled out with a 500 mM NaCl concentration on one inlet and nanoparticle dispersion on the other. The final conductivity and NaCl concentration at both outlets, A_{out} and B_{out} , are characterized for the different flow investigated and summarized in the supplementary information (Figure 52). NaCl concentration have been chosen to be close to the salinity of ocean water, to create a similar salinity gradient as in the mangrove swamp (Figure 44).

Thereafter, we compared the temporal evolution of the size distribution of the plastic nanoparticle aggregates with that of a batch experiment as described in the literature, i.e. dropwise addition of concentrated NaCl dispersed into a nanoparticle dispersion to obtain a final NaCl concentration of 513,3 mmol L^{-1} and then manually stirred.

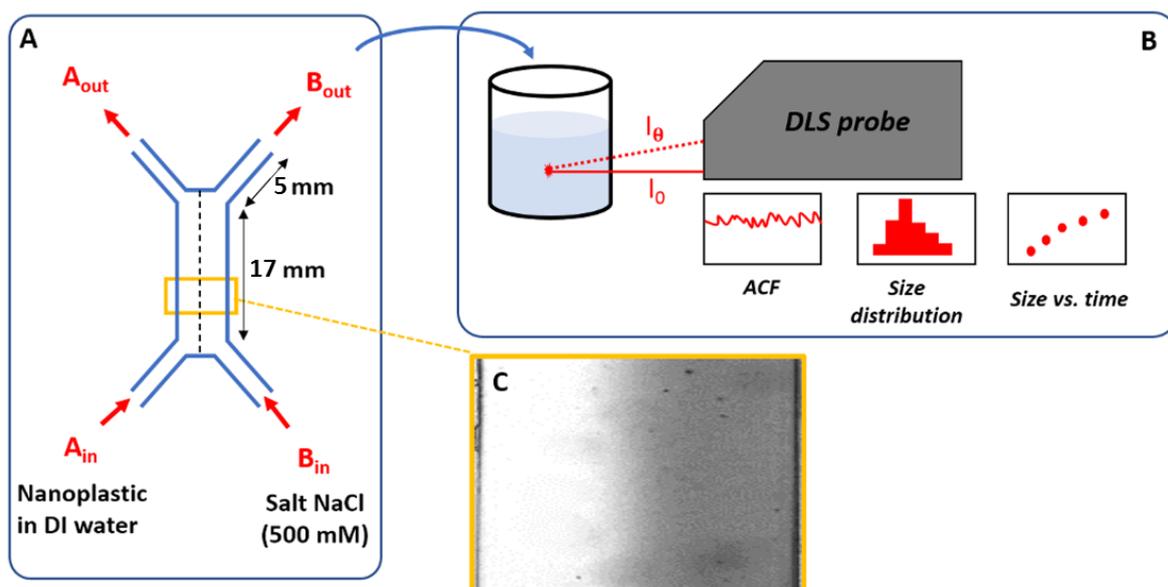


Figure 40 : (a) Sketch of the experimental conditions in the MD. After the particles flow through the MD, they flow into tubings and get collected in vials. (b) The DLS helps us to determine the evolution of the aggregate size over time. (c) View of the interface between the salty solution (B_{in})

and the nanoparticle suspension (A_m) from which we extract the profile of the salt concentration averaged over the height of the MD and perpendicular to the flow direction. This profile comes from an experiment with a flow rate $Q=2\text{mL/h}$ and was taken at the middle of the straight part of the MD.

Aggregation kinetics

Nanoplastics aggregation kinetics were determined using the classic approach developed by Smoluchowski (Smoluchowski, 1917). According to this theory, this is a two steps process: collision and attachment that are determined by the collision rate constants and the attachment efficiency α , respectively. The evolution of the nanoparticles aggregate concentration over time can be expressed as:

$$\frac{dn_k}{dt} = \frac{\alpha}{2} \sum_{i+j \rightarrow k} \beta(i, j) n_i n_j - \alpha N_k \sum_i \beta(i, k) n_i \quad (1)$$

With k the mass of aggregate and n the number of particles in the aggregate. β_{ij} is the collision frequency between two nanoplastics of different size with a mass of i and j . For colloidal population, β_{ij} is directly controlled by the Brownian diffusion. In case of homo-aggregation, equation can be expressed as:

$$\frac{dn_k}{dt} = -\alpha \beta_{kk} \left(\frac{n_k}{2}\right)^2 \quad (2)$$

During the first time of aggregation, the hydrodynamic diameter d_h grows linearly with time, and depends of the initial concentration of particles (N_0) and initial the aggregation constant k :

$$\left(\frac{d d_h(t)}{d t}\right)_{t \rightarrow 0} \propto k N_0$$

The aggregation rate is determined by the slope in the linear part of the aggregation curve $dz_h(t)$. The attachment efficiency α could be obtained by collecting aggregation rate at different electrolyte concentrations. The ratio between the aggregation rate in favorable conditions (k_{fast} , generally at high ionic strength, $>$ critical coagulation concentration) and unfavorable conditions (k_{slow}), normalized by the initial particulate concentration N_0 , allows determining α (Chen and Elimelech, 2007) , and expresses as:

$$\alpha = \frac{k_{slow}}{k_{fast}} = \frac{\frac{1}{N_0} \left(\frac{d d_h(t)}{d t}\right)_{t \rightarrow 0}}{\frac{1}{N_{0,fast}} \left(\frac{d d_h(t)}{d t}\right)_{t \rightarrow 0,fast}} \quad (3)$$

In the case of favorable condition, attachment coefficient $\alpha = 1$ and the aggregation rate is solely dependent on the efficiency of transport. K_{slow} et k_{fast} are the aggregation rate governed by reaction-limited aggregation (RLA) and diffusion-limited aggregation (DLA) processes respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Batch experiments

We perform aggregation experiments in batch-mode conditions with PSL and the PS-NP nanoparticles. Both particles are made of polystyrene but they have different size and shape distribution. PS-NPs are produced by various degradation processes to be representative (size and shape) of environmental nanoplastics (El Hadri et al., 2020). Figure 41 illustrates the principal result using the kinetics of aggregation with batch experiments for PS-NPs and PSL and the corresponding attachment coefficient. In order to facilitate comparison between the batch and the MD experiments we choose to describe the evolution of the ionic strength measured in the two MD outlets and the ratio between the mean hydrodynamic size of the aggregates over the initial one (D_{zh}/D_{zh0}). The increase in electrolyte concentration lead to an increase of the aggregation rate up to a certain concentration above which the slope does not increase further. This aggregation profile is typical of DLVO theory witch involve RLA regimes or DLA regime (Baalousha et al., 2013). When the salt concentration increases, the surface charge of the particles tends towards neutrality, which decreases the energy barrier and leads to the aggregation of the particles. When the critical coagulation concentration (CCC) is exceeded, the surface charge of the particles is completely neutralized, and the energy barrier is canceled. Consequently, even if the salt concentration increases beyond the CCC, the aggregation rate reaches a maximum and does not increase any more (Chen and Elimelech, 2007). Critical coagulation concentration is determined to be 450 mM for the PSL and 30 mM for PS-NP (Figure 42).

The higher CCC for the PSL value indicates their higher stability in aqueous solution compared to the PS-NPs at the same concentration. This enhanced stability may be due to the use of large variety of surfactant in the dispersion media. For PS-NPs, there are formed using polystyrene pellet. Such hydrophobic materials are generally carbon based nanoplastics with low surface charge. Despite a zeta potential of -44mV in aqueous system at pH 7 and low ionic strength, a relative low -COOH function quantity was measured (El Hadri et al., 2020). However, the CCC is way lower than the one obtained by El Hadri et al (2020), which is 256 mM. This difference could be imputed to the absence of residual ethanol on our NP because of an adjunction of a lyophilization step during the preparation. Additionally, no surfactants or other additives are present in the dispersing media. All these dispersions conditions and physicoal-chemical properties can explained the low CCC value compared to the PSL.

As expected, there is no aggregation as long as the salt concentration is not higher than the CCC (Figure 41 a-b). Also, because of the short time of acquisition (1 hour) the Reaction Limited Aggregation (RLA) mechanisms is not observed. Such mechanism would induced the formation of compact aggregates and slow aggregation kinetics (day scale) (Tang et al., 2000). In 500mM of NaCl, PSL and PS-NP aggregates rapidly to reach a dzH of 1200 nm after 100 minutes. This is a normal behavior for a concentration above the CCC, where aggregation follow DLA mechanism. During this mechanisms, particle aggregation is controlled by the diffusion, inducing an increases of the Z-average size to rapidly form open structure aggregates with a fractal dimension (D_f) generally ranging between 1.5 and 2.5; and a decrease of the particle number in the solution (Filella, 2006; Lin et al., 1989b; Tang et al., 2000).

Even though we work with the same concentration (11ppm, or $2.5 \cdot 10^9$ and $2\text{-}3 \cdot 10^9$ part mL⁻¹ for PSL and NP-NP respectively), the increase in size is different for the two particles. At the beginning PS-NP aggregates more rapidly than PSL with an aggregation rate of 15.4 nm min^{-1} against $12,2 \text{ nm min}^{-1}$ for PSL. But after 100 min PSL diameter increased by a factor 5; while PS-NP only reach a factor 3.8 (Figure 41 a-b). At the beginning of the aggregation, the different rate can be explained simply by the polydispersity of PS-NP (see size distribution in Figure 34 of SI) which involve hetero-aggregation process, and lead to create bigger aggregates faster than with homo-aggregation. Another explanation could be the size difference between the NP types. The slowdown in growth rate of PS-NP could be explained by their shape and the fractal dimension (Figure 41 a-b insert and Figure 50 in SI). Indeed, for asymmetrical shaped particles like the PS-NPs, the rate of agglomeration is slower, principally because of the entropic contribution induced by the shape. We also worked with carboxylated PSL for which we do not see aggregation at 500 mM. They have a very high CCC and even at 1026 mmol L^{-1} (60 g L^{-1}) of NaCl, no aggregation was observed. The negative surface charge coupled to steric repulsions caused by of the high density of -COO- functions, and the presence of surfactant, lead to a good stability of those particles, even at high ionic strength.

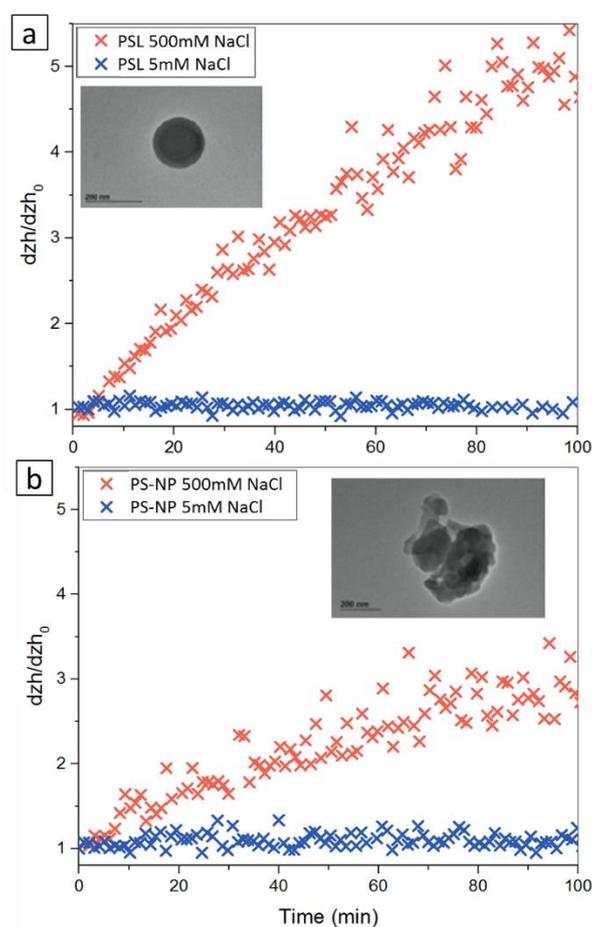


Figure 41 : (a-b) Size evolution of the nanoplastics models (11ppm), according to time at 5 and 500mM of NaCl: (a):PSL; (b):PS-NPs).

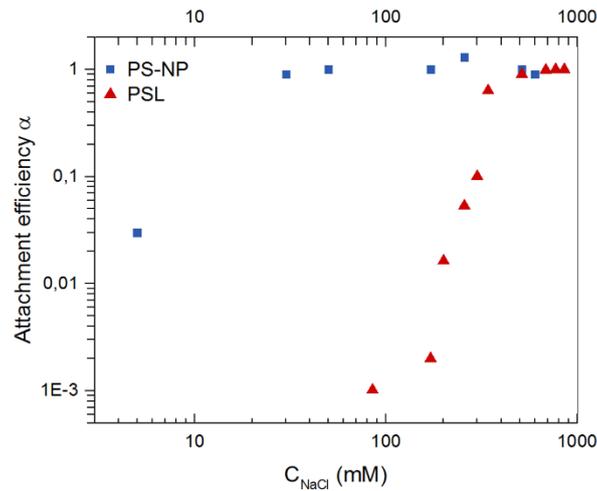


Figure 42 : Attachment coefficient according to the NaCl concentration for PSL and PS-NPs.

In the following, we worked different concentrations of nanoparticles with a salt concentration higher than the CCC, as illustrated on Figure 43. As expected, the mean aggregate size increases with the particle concentration from 1 to 11 ppm, for PSL and PS-NP. The dependency of aggregation rate with the particle concentration is coherent with equation (1) and (2) and is explained by the probability of collision between particles and aggregates. In our conditions, the aggregation is driven by particle diffusion, i.e., the DLA mode for which the attachment coefficient α is strongly dependent of the collision frequency β . For the lowest concentration we used, around 1ppm, the aggregation is rather limited. Indeed, there is no change on the d_{zh} of PSL, while there is a slight aggregation of PS-NP (factor 1.5). We supposed that in this case, the concentration is too low to form aggregates larger than doublets or triplets, which remains a minority compared to the population of the isolated single NP. For particle concentration 10 times higher, after this first linear variation, d_h evolve to reach a quasi-steady state meaning that all the particles have become part of an aggregate. In this state, aggregates grows slowly than during the first times of aggregation because the concentration of primary particle is low enough to prevent the formation of larger clusters. Therefore, since the aggregation is governed by interaction and collision between aggregates there induce more variability in d_{zh} (Zhang et al., 2012). After reaching a certain size, aggregates tend to sediment and variability and larger PSD of d_{zh} is generally observed.

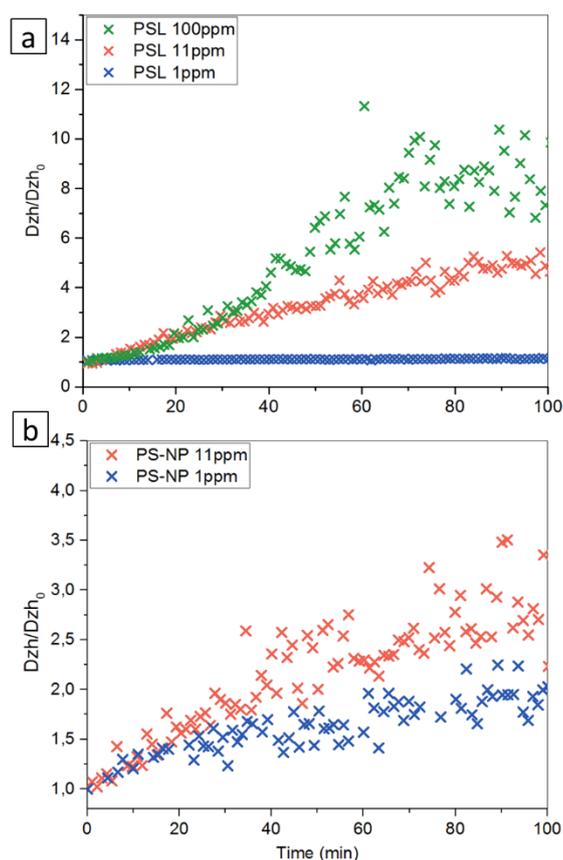


Figure 43 : Size evolution of the (a) PSL and (b) PS-NPs at 500mM for different nanoplastics concentration.

In literature related to nanoplastics and their stability in natural media according to the ionic strength and pH, a large focus has been made on the influence of the PSL surface. Up to our knowledge, no consideration of the formation pathways (synthesis or ageing) and heterogeneity in shape and structure of nanoplastics have been made. Here, our batch mode experiments give a crucial indication on the relevancy to have appropriate models to investigate the environmental fate, behavior and impact of nanoplastics models. However those type of aggregation experiments are not representative of the various physical and chemical heterogeneities that characterized natural media (living organisms or environmental media), like the flow and the ionic strength heterogeneities in space and time. Hereafter, we propose to use microfluidic experiment to better apprehend the fate of nanoparticles in natural dynamic environments like estuaries and mangroves.

Persistence of the salinity gradient in the mangrove

As expected those variations are not the same whether we are in a rising tide or in a falling one. For the rising tide we distinguish two zones depending on the depth in which there are distinct salt concentrations (Figure 44c, zone 2). In the first zone that spreads over the first 0.5-0.75m below the surface there is a salinity gradient, while deeper in the second zone spreading over 1m, the salt concentration is rather homogeneous. These evolutions of the salt concentration are directly linked to the incoming flows in this arm of the *rivière salée* during the rising tide. While there is a continuous flux of fresh water, from the East towards the West, the seawater is flowing in the opposite direction. It invades the river arm below the surface at the depth around 0.5-

0.75m below the surface, depth at which the salt concentration is hence the highest. As we go further inside the river arm, far from its entrance connected to the “Rivière salée”, the slope of the salinity gradient become smaller (Figure 51 in SI). During this invasion process the salt contained in this finger of seawater diffuses into the two zones. Since the flowrate of freshwater in the first zone is the faster the diffusion of salt is less important in this zone and leads to the formation of the salinity gradient that spreads all along the first zone. Inside the second zone, the salt diffusion is faster, the flow rate being slower, and we end up rapidly to a more or less homogeneous salt concentration in this zone. During the falling tide (Figure 44c, zone 1) the amount of salt coming from the seawater decreases rapidly which leads to a broadening of the salinity gradient which spreads almost 1.5m. The salinity gradient is also smoother than in the rising tide, with a maximum salt concentration around 28 g L^{-1} instead of 36 g L^{-1} . It is worth noting that in both tide phases there are periodic oscillations of the salt profile with a period around 40 minutes, which change the position of the maximum salt concentration. As a result the salinity gradient is consecutively stretched or compressed, phenomenon for which we have no physical explanation yet and, up to our knowledge, was not reported in literature. From all these results we can conclude that in the river arm there is always a salinity gradient over the first 0.5-1m and thus there is no global mixing phenomenon leading to a homogenization of the salt concentration. This is the first time that such salinity profile for a mangrove is obtained, opening new ways of thinking on the fate of colloidal suspension that are present in such environment. In particular we may ask ourselves what will happen when nanoplastics produced in the landfill are transported through the soil and reach the mangrove.

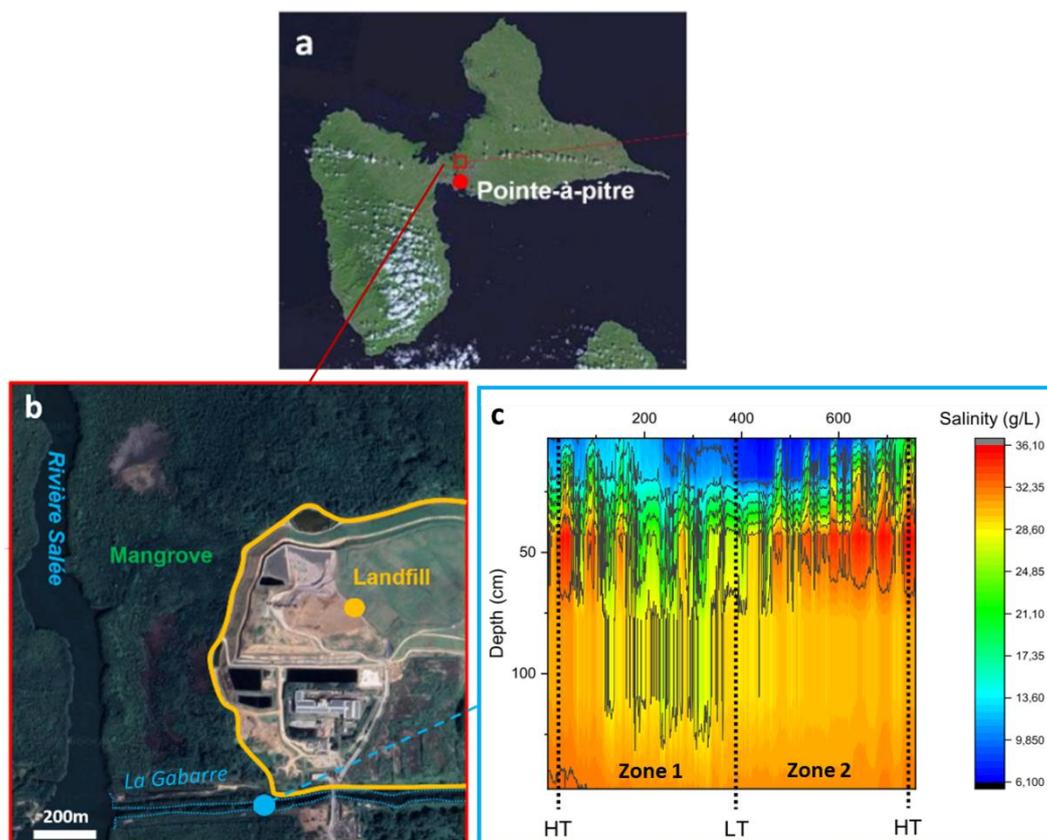


Figure 44: (a) Location of the sampling zone on the French Caribbean island of Guadeloupe. (b) Detail of the landfill in the mangrove swamp and the sampling location point. (c) Temporal evolution of the salinity gradient along 1.5 m of water from the surface of the water. HT and LT

correspond to high and low tide, respectively, while zones 1 and 2 are the falling and rising phases of the tide.

To evaluate the presence of colloids in the Mangrove swamp, we measured the colloidal Cu(II), as such it is known for its strong affinity with the colloidal fraction. Indeed, nanoplastics are expected to be dissimulated/mixed through the natural and other anthropogenic colloids. Our result gives a colloidal concentration of Cu of 3.2 ng g^{-1} , 7.7 ng g^{-1} and 2.7 ng g^{-1} , at depth 0cm, 50cm and 100cm, respectively. Clearly an accumulation of colloids in the salinity gradient zone (30-50cm) is observed raising key questions on the fate and transport of nanoplastics from the land to the sea in a mangrove in between them.

Dynamic experiments: flow within the microfluidic device

We use a MD to simulate a salinity gradient of NaCl. We flow a dilute suspension of PS-NP and PSL in one inlet of our MD for different flow rates, Q , from 0.5 up to 10 mL h^{-1} , while in the other inlet, a NaCl solution at 30 g L^{-1} , corresponding to 500 mM , is injected with the same flow rate. By playing with the flow intensity we can control the residence time of the nanoparticles and their diffusion through the salinity gradient, particles spend 0.4 up to 8 s in the straight part of the MD (Figure 40a) for the highest and lowest Q value respectively. The evolution of the aggregate size is obtained by DLS measurements inside each vial connected to the two outlets, A_{out} and B_{out} . It is worth noting that there is a 20 cm tubing, with an inner diameter of $360 \text{ }\mu\text{m}$, which makes the connection between the outlets and the vials.

A careful investigation of the conductivity (calibrated according to the NaCl concentration) was performed at the two outlets for all flow rates (Figure 52 in SI). NaCl concentration is ranging from 27 up to 73 mM in A_{out} for decreasing Q , while it goes from 390 up to 450 mM in B_{out} , for increasing Q . This evolution of the salt concentration in the vials indicates that there is a diffusion somehow of the salt in the nanoparticle outlet.

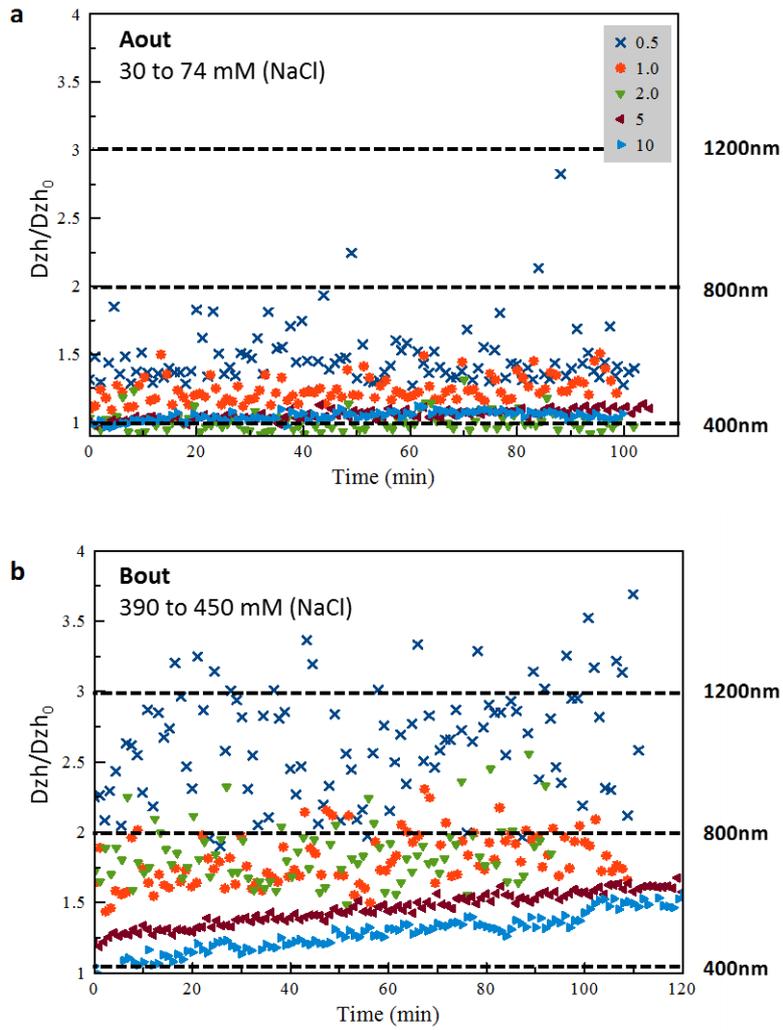


Figure 45: Size evolution PS-NPs according to the different Q (0,5 to 10 ml h⁻¹) in the microchip at the (a) A_{out} and (b) B_{out} .

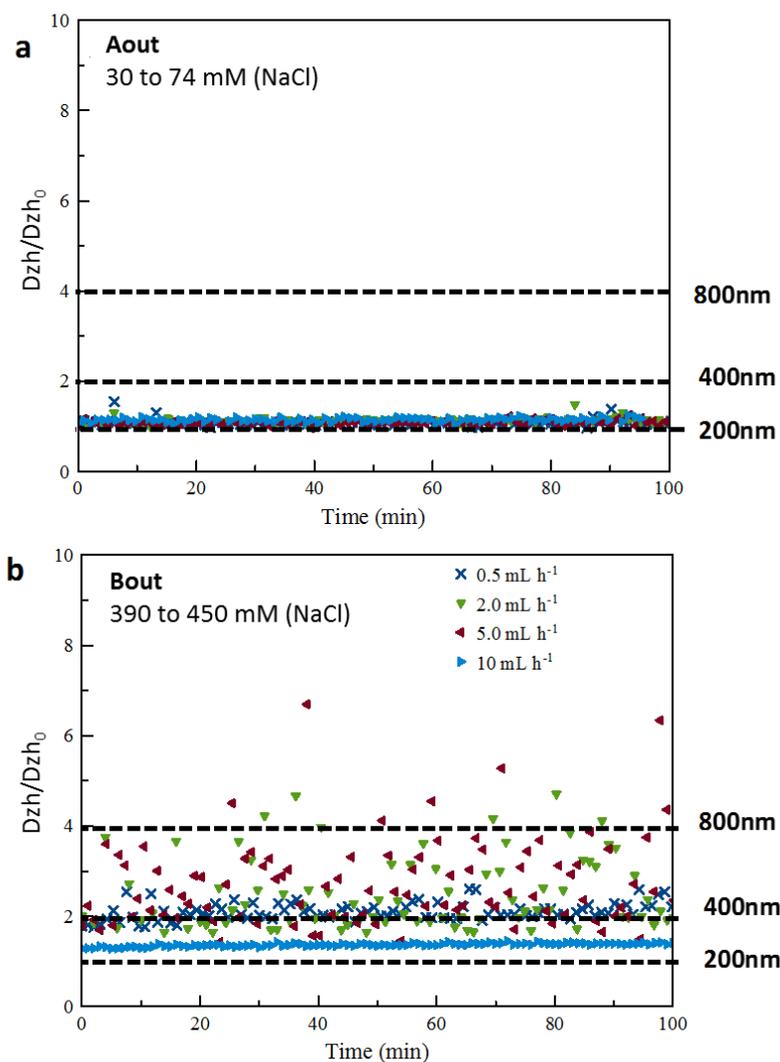


Figure 46 : Size evolution PSLs according to the different Q (0,5 to 10 ml h⁻¹) in the microchip at the (a) Aout and (b) Bout.

We will focused on the evolution of aggregate size of NPs in the microfluidic experiments, thanks to the DLS measurements in the vials presented in Figure 45 and Figure 46. In the vial A_{out}, the aggregation process is rather limited for both NP (PS-NP and PSL), which is consistent with the high CCC value of PSL. But for PS-NP, the ionic strength is always higher than the CCC, whatever the flow rate. In addition, the concentration of nanoparticles injected in the MD is high enough to observe slow aggregate growth according to the batch experiment with PS-NPs (figure 2b). But, there is almost no aggregation over time for $2 < Q < 10$ mL h⁻¹. There is a slight increase of the aggregate size, up to around 1.3 and 1.5 times the initial particle size for the two lowest flow, 0.5 and 1 mL h⁻¹ respectively. Aggregate size that is still lower than those obtained in the batch experiment (around 3 times Dzh₀).

The results for vial B_{out} are even more surprising (Figure 45, and Figure 46). First of all, aggregation takes place regardless of the flow rate even if NP are not supposed to be present in this vial. Indeed the Péclet number is high enough ($> 10^4$) to prevent particles to enter in the salty outlet. Even if the ionic strength is over the CCC ($I > 450$ mM) for all Q values, the mean aggregate size is well below the one we get in the batch experiments (Figure 41). The aggregate

size is ranging from 1.5 up to 3 D_{h0} for PS-NP after 120 minutes following the transit in the MD. Furthermore, for 1 and 2 ml h^{-1} aggregates seems not growing over time and remain quite stable, because the average diameter is roughly the same at the beginning of the measurement and at the end 100 min after, even if there is some variability over time. Similar aggregation mechanism coupled to a stability during time, have been observed previously for fullerene aggregates (Gigault et al., 2018b). This corroborate a distinctive aggregation behavior due to passing through a salinity gradient. At high speed flow rates, the final size obtained and its temporal variation are very repeatable. To the opposite, when the flow decreases and the aggregate sizes keep constant, a large difference of the final size compared to the initial one is observed coupled to a higher variability. It appears that the final aggregate size become smaller when Q increases. At the high flow rates (5 and 10 mL h^{-1}), the PS-NPs size is increasing according to the time, which clearly indicates that their aggregation keep continuing.

There are two ways to rationalize these surprising results about the aggregation in the two vials for PS-NP. In A_{out} vial, because there is a salinity higher than pure water, this implies that a part of the concentrated NaCl solution migrated across the channel to end in the A_{out} vial. That mean particles going out in the A outlet have crossed a salinity gradient (from 0 to 27-73 mM). We suggest that either NP went through important changes inside the salinity gradient, they get stabilized somehow against aggregation even in a high ionic strength condition, largely favorable for aggregation. This means that the residence time of particles in the salinity gradient is one of the key parameter. Another hypothesis could be that we lose most of the nanoparticles in their way towards the vial A_{out} . In this case, they are too diluted to meet each other and form even tiny aggregates as small as doublets or triplets. Indeed, nanoparticle concentration is around 32% of the mother dispersion for PS-NP in the A_{out} vial at 2 ml h^{-1} .

For B_{out} vial, the enhanced aggregation compared to the A_{out} vial first indicates that an important number of particles went across the salinity gradient in order to reach B_{out} vial. In addition, this particle concentration is large enough to allow aggregation by diffusion in the vial. The mean size is lower than in batch mode because particle concentration is also lower (17% of the initial concentration, i.e. around 2ppm, at 2 ml h^{-1}). At high flow rates ($>5 \text{ mL h}^{-1}$), due to the high transport efficiency and the short residence time of the particles ($< 1 \text{ sec}$) nanoparticle do not stay for a sufficient time in the salinity gradient before reaching B outlet and relatively few nanoparticles are eluted in the B_{out} . The lowest final size of PS-NPs may be due to the higher dilution of the nanoplastics in B_{out} compared to 2 ml h^{-1} .

To understand such behavior we have to look at the various phenomena that take place from the injection of the NP in the MD up to their aggregation in the vials (Figure 47). The Péclet number within the Q range is always higher than 10^4 , which means that nanoparticles do not diffuse as they flow through the MD. Therefore, NP cannot explore the half part of the channel in which the salty solution flows because thermal diffusion alone is not able to transport colloids across the laminar streamlines, within the short length of the channel (Abécassis et al., 2008). However, we found an important number of nanoparticles in the salty outlet B_{out} , high enough to be detected with a DLS. It turns out that diffusiophoresis is responsible of this particle migration towards B_{out} (Ebel et al., 1988). The particles that arrive in B_{out} have previously gone across a salinity gradient that takes place along the plane perpendicular to the flow direction (Figure 47b).

Actually this particle drift results from the coupling of two phenomena (Abécassis et al., 2008). First the molecular diffusion of the salt toward the part of the channel containing the particles, which is much faster than the particle diffusion. Indeed, the maximum salt concentration is supposed to be at the middle of the MD, at 400 μm from each lateral sides, since the flow rate, here equals to 2 mL h^{-1} , is the same in both inlets. While the maximum salt concentration is actually at 100 μm off center inside the salty suspension. (Figure 47b).

Secondly, we have also a diffusiophoretic drift of the particles, due to the salinity gradient. NP tend to drift near the region where the salt concentration is the highest (Abécassis et al., 2008), hence at 100 μm inside the part of the channel filled by the salty suspension. Therefore, those drifted particles will eventually come out of the MD by the outlet B_{out} and not by A_{out} .

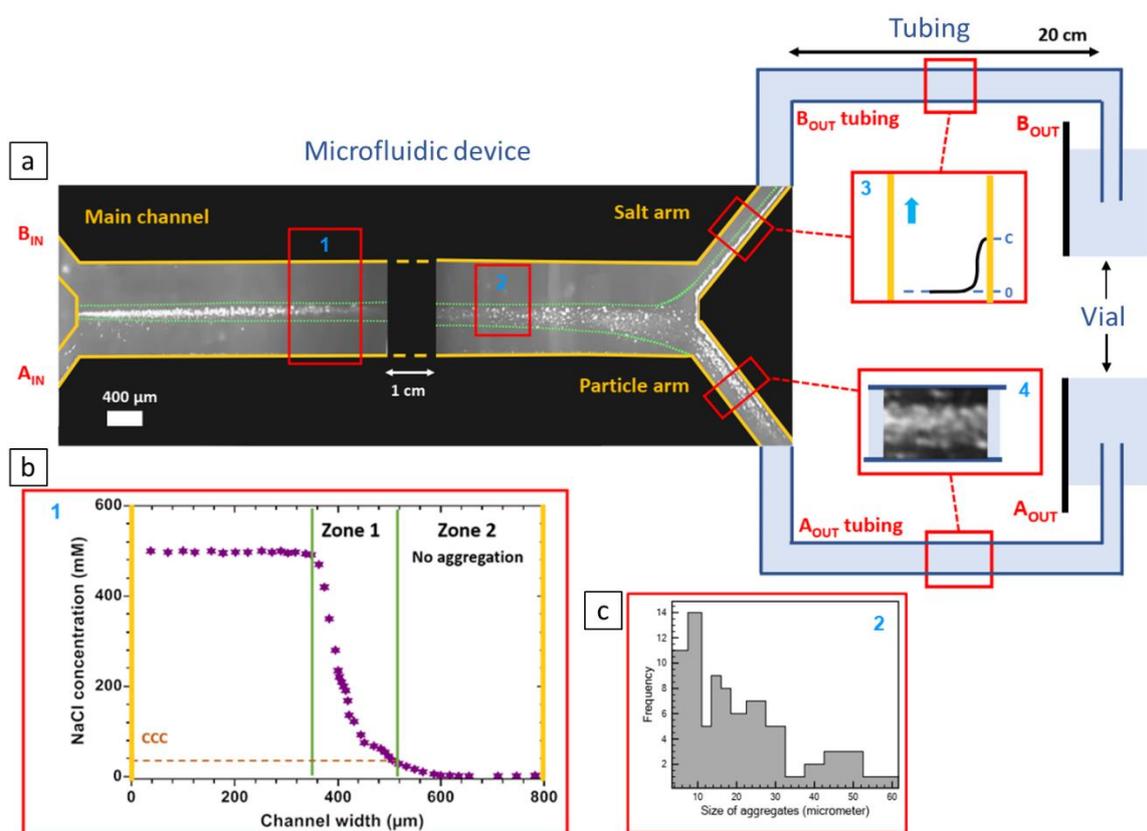


Figure 47 : (a) Illustration of the microchip with the deposition PS-NPs after 1 hour of flowing at 2ml h^{-1} ; (b) Salinity profile through the MD height; (c) Number-based distribution of aggregates deposited in the MD according to the size.

It is worth noting that all the particles are not going in the vials connected to A_{out} or B_{out} . We estimate that few percents of the particles are deposited in the MD, in its upper part, forming relatively large micrometric aggregates for both types of NP (Figure 47c) that move upwards until they get into contact with the top part of the MD (Figure 47a). Such deposition pattern takes place within a band along the flow direction that spreads over 150-200 μm for the PS-NP and over 50-60 μm for the PSL (Figure 54 in SI).

A discrimination in size appears between the beginning and the end of MD. While small aggregates are principally observed at the beginning, the large ones are the most predominant at the end (Figure 55 in SI). This indicates that aggregates are growing along the salinity gradient in the center of the microchip.

Since the aggregation band is located near the middle of the MD, the aggregates are stuck on the top wall because the electrostatic barrier of the PDMS is completely screened by the high salt content. We do not know if the size of the aggregates in this band is only due to the aggregation in the bulk of the MD, followed by creaming and immobilization on the wall. Indeed, aggregates may also roll on the top wall and become larger when they encounter other ones and merged with them forming in this way larger aggregates. Anyway, before they cream, the aggregates are likely formed by colliding events between either individual particles or aggregates since the Péclet number is high enough to consider that the aggregation is mostly orthokinetic, hence the particle diffusion being negligible. Additionally, NaCl concentration is above the CCC of PS-NP and is sufficient to induce PSL particle aggregation in batch condition. Those two parameters, salinity and collisions, combined could cause particles aggregation.

In the case of PSL, indeed the maximum salt concentration is around the CCC and decreases quite rapidly as we travel along the salinity gradient (Figure 47b). On the overall width of the deposition band at the top of the MD the salt concentration drops from 500 down to 200 mM. Therefore the orthokinetic aggregation of the PSL is effective even though the particles still have a net surface charge that protect them against aggregation by Brownian diffusion. The flow helps the colliding particles or aggregates to overcome this electrostatic barrier and adhere one on another thanks to the van der Waals attractive forces.

Since the mean size of the deposited aggregates is quite large (Figure 47c), we may suppose that the flow does not fragment significantly the aggregates, meaning that they have a great internal cohesion and a strong adhesion on the PDMS surface (Dersoir et al., 2015) preventing them to be broken by the shear.

There is also particle deposition all across the Aout arm, while it is rather limited in the Bout arm, mostly close to the lower lateral wall (Figure 47a). These deposition patterns hence suggest that there is also particle aggregation followed by creaming in both arms, even though the amount of aggregates deposited here has to be small since the arms are only 3mm long. At the outlets of the MD, particles flow through the 360 μm diameter cylindrical tubing that are 20 cm long before reaching the vial. We estimate that the residence time within these tubing is at least twenty times longer than in the MD, which has a huge impact on the aggregation, the creaming and the adhesion on the surface of the tubings. Indeed, the Péclet number is still very high inside the tubing and thus orthokinetic aggregation are also important and leads to the deposition of aggregates on the upper surface of the tubings. The length of the tubings is 10 times longer than the length of the straight part and the outlet arm of the MD. From this ratio, we estimate that among the 46% of particles sequestered in the MD, nearly 90% of the particle aggregation and creaming takes place in the tubing. But, this quantity is not equally distributed between the two tubings. The tubing connected to Aout transports a large amount of particles that can form large aggregates and eventually cream, as in the MD. The orthokinetic aggregation in this tubing is thus important since the particle concentration is high and the salt concentration is above the CCC. Therefore, most of the injected particles in the MD eventually lie on the top of the tubing and only few % are able to reach the vial connected to Aout, depending on the flow rate. For the higher flow rates, $2 < Q < 10$ ml/h, there is no difference of the mean particle size in Aout, for the different flow rate. Because of the creaming there is a dilution and particles are too far to each other to form something else than tiny aggregates that do not contribute to the DLS signal (Figure 48). This is not true anymore for lower flow rate, for $Q=0.5$ and 1mL/h where

the aggregate size increases when Q decreases, even though it remains rather limited. Indeed, in this case, the flow conditions in the microchip are too slow to maintain an ideal and homogeneous distribution of the flow between A_{out} and B_{out} . This lead to the formation of turbulence instead of a laminar flow, and a forced mix before one of the outlet alternatively, explaining the higher salinity values in A_{out} vial (Figure 52 in SI). In this condition, this flow rate can be more assimilated to batch mode experiments in A_{out} and B_{out} .

Let's focus on the other outlet B_{out} . In this case, the salt content in the tubing connected to B_{out} is always above the CCC for both NP, and thus facilitates the orthokinetic aggregation and the formation of micrometric aggregates. However, in such case, the concentration of particles in this tubing is much smaller than in the other tubing leading to less particle deposition in the tubing. Indeed, thanks to the diffusiophoretic effect, only a part of the particles injected in the MD have migrated across the salinity gradient and reach B_{out} , not more than 25% according to Abécassis et al. (2008), and around 17% according to our results (at a Q of 2 ml h^{-1}). In addition, the particles that enter in this tubing are not homogeneously distributed and stay in a zone where the shear is the lowest. Indeed, when they enter in the arm just after the main straight channel they flow near one lateral wall (Figure 47a) and since the Péclet number is still high, they keep flowing near the surface. Therefore, there is probably less aggregation by collision in this tubing and as a result, even though there are less particles that enter in the tubing connected to B_{out} than to A_{out} , most of them are able to reach the B_{out} vial.

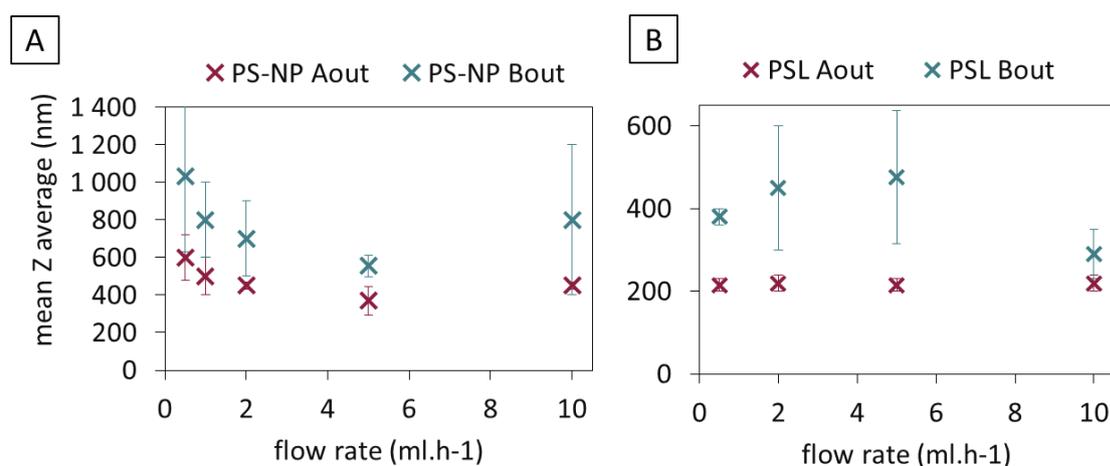


Figure 48 : Plot of the average size for (a) PSL and (b) PS-NPs within the kinetics (100 minutes) at the A_{out} and B_{out} according to Q (mL h^{-1}).

However there is an increase of the mean aggregate size when Q decreases (Figure 48). We suppose that this evolution comes from the position of the salinity gradient inside the straight part of the MD, close to which particles come and accumulate (Abécassis et al., 2008). The position of this salinity gradient depends on the flow rate and the Brownian diffusion of salt across the flow streamlines. The relevant length scale for this problem is the saturation mixing length for the salt,

$$l_s = \frac{h^2 \cdot U}{D_s}$$

with h the height of the MD, U the average velocity of the flow and D_s the diffusion coefficient for the salt. Here the channel is much wider than taller, $w \gg h$, the salt as it enters in the straight part of the MD and flows over the first micrometers, it diffuses across the height. Thereafter the salt diffuses across the width of the channel, perpendicular to the flow direction until the salt has explored all the channel width. During that diffusion process the salt moved by advection in the flow direction over distance equals to l_s from the entrance. Beyond this distance l_s the profile of the salt concentration in the MD cross section does not change any more as we go further downstream. In our experimental conditions l_s is smaller than the length of the straight part of the MD only for the two lowest flow rates, 0.5 and 1 ml h⁻¹ (see **Table 2** below). For these flow rates the full mixing of the salt by diffusion is reached inside the MD.

Table 2 : Variation of the mixing length according to flow rate

Q(ml h ⁻¹)	l_s (mm)
0.5	6.85
1	13.71
2	27.41
5	68.53
10	137.06

For low flow conditions the particle drift due to the salinity gradient brings particles deeper inside the part of the channel where the salty suspension is flowing. In the following since the position of those accumulated particles in the channel cross section does not change they leave the MD passing through the B_{out} outlet. We conclude that the particle concentration in the B_{out} tubing and in the connected vial increases when the full mixing of the salt takes place inside the MD, which is the case for $Q \leq 1$ ml h⁻¹. Since the particle concentration is 17% ±6 of the initial concentration ($C_i=11$ ppm) in the Bout vial for 2ml h⁻¹, we can estimate that, at low flow rate, concentration should be slightly higher than 17% of C_i i.e. higher than 2 ppm. To verify this hypothesis, aggregation kinetics was performed in batch mode using low particle concentration corresponding to 10% of 11ppm, and we observed a similar evolution for the mean aggregate size over time than with $Q=0.5$ ml/h (Figure 53 in SI). This result showed that particle concentration in Bout at low flow rate is probably not so far from 17% C_i . However, as said above, there is a random flow distribution and a turbulence mix at this flow rate, leading to a random distribution of the particle between the two outlets. Consequently, the concentration of particles in the Bout vial does not reflect the theoretical prediction.

This experiment clearly shows that our MD acts as low pass filter for the particle size, due to the high salt content (>CCC) and the salinity gradient. Indeed, all the aggregates formed in the salinity gradient will eventually either cream or sediment in the MD or in the tubing, and single particles and small sized aggregates are able to reach the vials and remain stable in the high salinity medium. This massive deposition is due to the coupled effect of the high level of salt in the salinity gradient, which is higher than the CCC, and the diffusiophoretic drift, which increases the particle concentration near the region where the salt concentration is the highest. This increase in the particle concentration in turn increases the rate of particle collision, the aggregation rate and the aggregate size. This orthokinetic aggregation under flow conditions

produces very large aggregates compared to what we obtained in batch experiments with the same salt concentration where only diffusion controlled the aggregate growth.

Environmental implications

We first show that when freshwater and seawater meet in a mangrove it leads to complex flow patterns and heterogeneous spatial salt concentration. In particular salinity gradients take place in many spots in mangroves whether during the ascending or the falling tide. These gradients have a long time persistence which enhances the migration of colloidal matters in their vicinity. Since it is rather difficult to study nanoparticles aggregation in highly dynamical environments, both spatially and temporally, like mangroves we performed a model microfluidic experiment during which we are able to monitor the fate of NP under flow condition and also with a heterogeneous spatial repartition of the salt in the MD. The objective of this experiment was clearly not to simulate a specific zone of a mangrove but rather to study the particle aggregation dynamics under some specific conditions encountered in mangroves. Indeed these experiments allow us to control the flow conditions of both the freshwater and the seawater, establish a spatial salinity gradient in the channel and monitor the diffusiophoretic drift of the NP due to this salinity gradient, and determine some of the features of the particle aggregation due to the shear flow.

Our results demonstrate that (i) Aggregation mechanism are influenced by particle size, shape, surface composition and concentration, (ii) aggregation mechanisms are governed by dispersion mode, (iii) dispersion in dynamic conditions in a salinity gradient controls the final aggregate size and size distribution that will remain stable in aqueous solution.

How can these results be extrapolated to mangroves? To answer this question, we consider two relevant time and length scales of particle transport in the MD. First, the residence time inside the MD, and thereafter in the tubing, for the NPs that eventually reached the vials was between 4 and 80 seconds, depending on the flow rate. Everything happens on this short time scale where the aggregation induced by the salinity gradient is much faster than in batch. Over longer times, this phenomenon will integrate all these aggregations throughout a mangrove. As a result, only a small fraction of NPT that is not aggregated or slightly aggregated will be released into the ocean, and the other majority will remain flocculated (deposited and creamed in various forms) in the mangroves (associated with natural colloid, sediment etc). Indeed, we suppose that NPs will remain in the mangrove for a much longer time, even though the average flow rate may be faster than that in the MD, since the mangrove is much larger than the MD. This longer residence time will greatly increase the probability of the NPs becoming involved in aggregation processes with either other NPs of the same type or, more likely, with the rest of the colloidal matter in suspension, in particular with organic matter. This longer residence time will also favor NP aggregation since it will increase the diffusiophoretic drift of the NPs towards the high salt-concentration zone in the water column, which will lead to a decrease in the surface charge of the particles.

Second, the growing aggregates cannot move more than 35-180 μm before becoming attached to the MD or the tubing walls. Therefore, aggregates cannot substantially increase their size

before becoming immobile on a wall, i.e., they do not encounter more than one or two other particles/aggregates during their creaming/sedimentation. In the mangrove, the salt concentration is high at depths from tens of cm up to a few meters, which is at least three orders of magnitude deeper than the depth of the microfluidic experiment. Therefore, we expect that in a mangrove, the average mean size of the aggregate can become much greater than in the MD, since the aggregate can encounter many other aggregates as they either sediment or cream. In addition, the mean aggregate size being higher will increase the collision rate, since larger aggregates have a greater surface area and thus a higher chance of colliding with another aggregate

However, in this study other parameters have not been investigated such as natural organic matter, divalent ions, or other iron oxide particles. On-going studies are deployed to complete such studies in term of physical (DLVO, DLA and RLA simulation) and chemical (hetero-aggregation vs homo-aggregation) characterization.

This rough analysis seems to suggest that NPs and especially nanoplastics that enter mangroves from Land would be filtered and that only a small fraction would reach the oceanic system as either small (nanoscale) or large (micrometer) floating (low density) aggregates of nanoplastics. This fate would be due to the strong salinity gradient as well as the varying flow conditions that also favor particle aggregation by collision, which is much more efficient than aggregation driven by Brownian diffusion. NPs likely forms heteroaggregates rather than homoaggregates since there is a high content of dissolved organic matter in mangroves. This hypothesis should be verified by analyzing the sediment in those areas or by using a Manta net to trap microplastics or nanoplastics aggregates with micrometric size from the water surface.

All these results demonstrate the importance to investigate the fate and impact of plastics in this transition area where the salinity changes compared to the oceanic and other systems where the dynamics, the dilution and the physical and chemical conditions are generally constants. It is also necessary to use representative particles models with reliable change in size and structure (Table 3). From an ecotoxicological point of view, the final size and stability are the most influencing parameters on the toxic effect (bioavailability, bioaccumulation, tissues and organs distribution, etc.).

The scientific community has devoted substantial effort to detect stable single particles (at trace concentrations) or otherwise looking for particle accumulation in environmental systems. As seen here, a change in the stability of the particle size induces modifications that prevent their identification in environmental media. Our results suggest that we have to take into account the dynamic character of the aggregation process to accurately determine the fate of nanoparticles in natural environments such as mangroves and estuaries. New sampling strategies need to be developed to detect (hetero) aggregates of nanoplastics/NPs, taking into account the specific characteristics of these substances that lead to their different reactivity to trace elements and other natural components.

Table 3: Environmental implications of the nanoplastics fate in salinity gradient

Field	Environmental significance and implication
Detection in environmental system	Analytical strategy to detect specific size distribution (single-particle based technique) could miss the detection of final size of nanoplastics aggregates Sampling strategy needs to be specifically develop to detect aggregates of nanoplastics
Fate and reactivity of nanoplastics in environmental systems	Nanoplastics can be transported through the salinity gradient in natural systems Specific aggregation will lead to different reactivity regarding metal trace elements and other natural elements
Ecotoxicological and impacts of nanoplastics	Initial size of nanoplastics cannot be used as the key factor for toxicological effect The final size and shape distribution will induce different interactions with organisms (bioavailability, bioaccumulation, organs and tissues distribution, ...)
Remediation (engineering processes)	Water treatment development need to consider the stability and the transportation. Flocculation process using ionic species could not filtering all the colloidal suspension Appropriate filtration strategy to remove stable nanoplastics aggregates along the salinity gradient. Developing chemical filtering process based on the aggregation mechanisms of nanoplastics

SUPPLEMENTARY INFORMATION

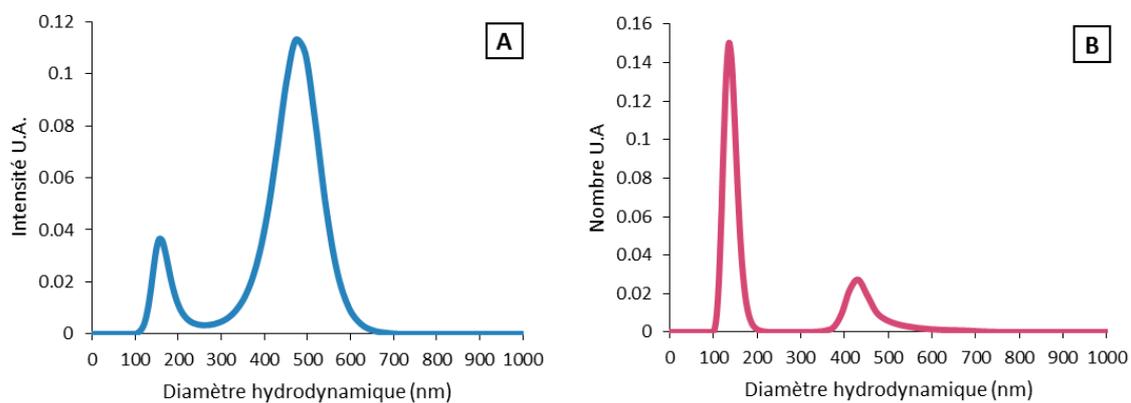


Figure 49 : Hydrodynamic size distribution of PS-NP according to SBL algorithm. A: hydrodynamic diameter weighted by intensity. B: number distribution

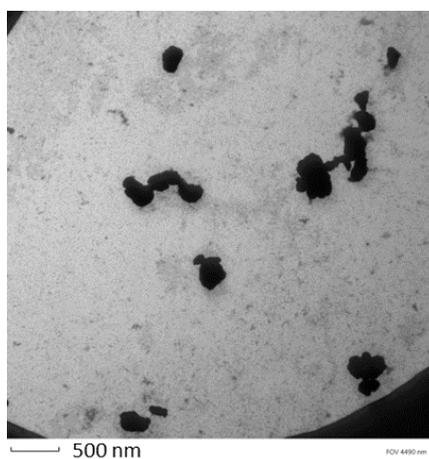


Figure 50: Electronic microscopy images of PS-NP

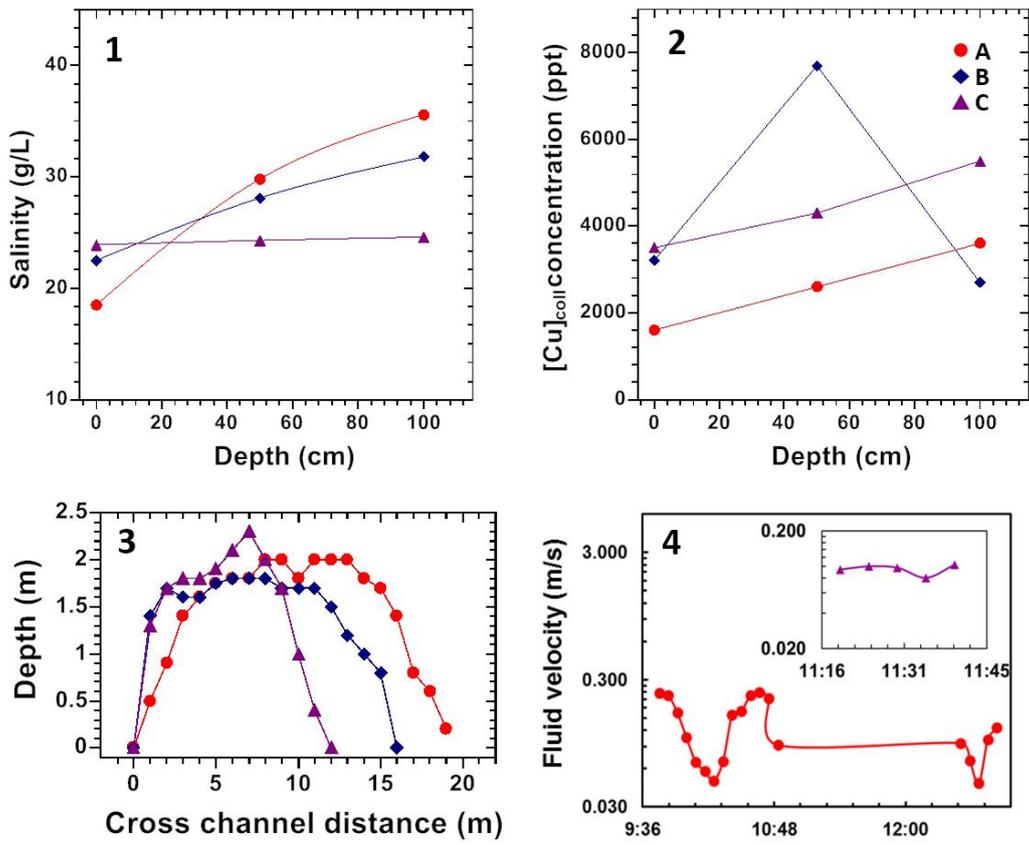


Figure 51 : (top) Image of the river arm with the three sampling points. (middle) Variation of the salt concentration and Cu II with the depth in the water column, at the three sampling points, from left to right, respectively. (bottom) Cross section of the channel at the three

positions (3). Temporal evolution of the fluid velocity at the surface at the point A and at the point C in the inset (4).

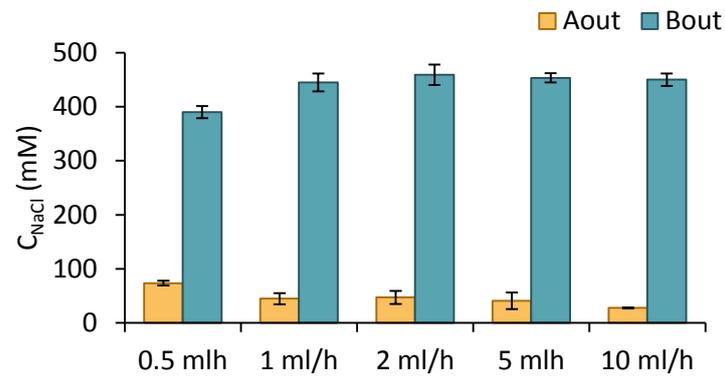


Figure 52: NaCl concentration in the vials of Aout and Bout. Average standard \pm deviation.

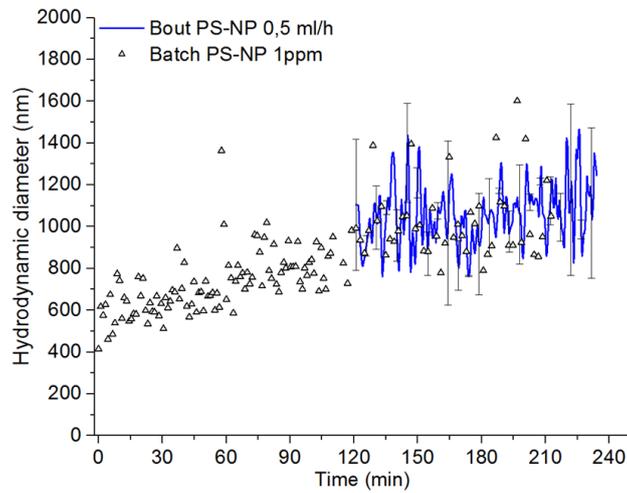


Figure 53 : comparison of aggregation kinetics of PS-NP obtained batch experiment (1ppm) in 500mM NaCl, to microfluidic experiment at 0,5ml⁻¹. Bout : Average curve \pm standard deviation.

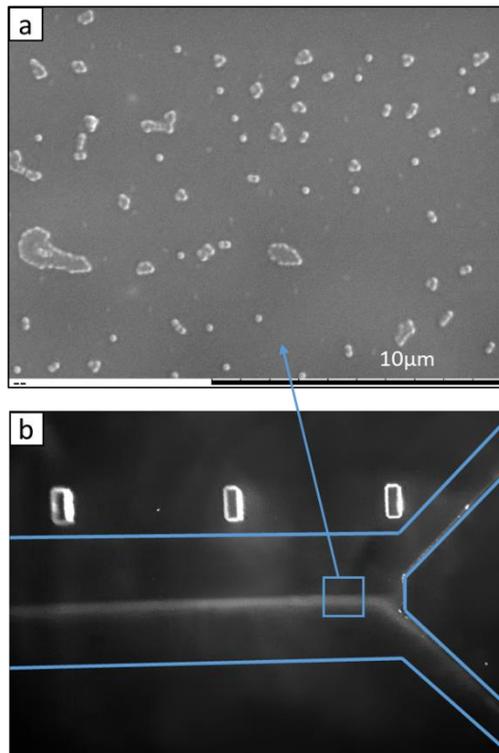


Figure 54: (a) Scanning Electronic Microscopy image of PSL aggregates taken inside the MD. (b) Picture of aggregate band inside the microchip.

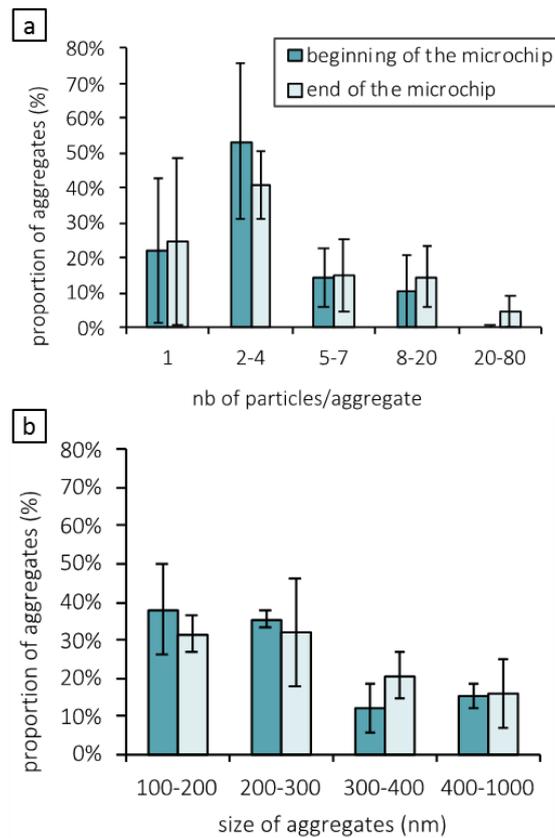


Figure 55 Size of aggregates obtained for (a) PSL and (b) PS-NP at the beginning and at the end of the microchip.

III.2 Résultats complémentaires

III.2.1 Caractérisation colloïdale des milieux de dispersion

Les nanoparticules ont été dispersées dans les milieux d'exposition des organismes, utilisés pour le volet écotoxicologie du projet PEPSEA. L'eau de mer artificielle (EdM) de la marque *Instant Ocean*® est utilisée pour les huîtres de Guadeloupe à raison de 30 grammes de poudre par litre d'eau (salinité de 30), sa composition résumée dans le Tableau 21 en Annexe II. Les algues unicellulaires, quant à elles, sont cultivées dans les milieux de culture Dauta (Tableau 22 en Annexe II; Dauta, 1982) et F/2 (Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962) pour les algues d'eau douce (*Scenedesmus subspicatus*) et d'eau de mer (*Isochrysis galbana* et *Thalassiosira weissflogii*) respectivement. Le milieu F/2 est composé d'eau de mer filtrée (1 µm) à laquelle des minéraux et vitamines sont rajoutés selon la composition résumée dans le Tableau 23 en Annexe II.

Afin d'éviter tout biais lors de la mesure des particules, les milieux de dispersions ont été mesurés en utilisant la DLS, pour vérifier la présence de colloïdes. L'eau ultra-pure a été utilisée comme référence pour déterminer un milieu exempt de colloïdes. La ligne de base de l'eau ultra-pure est très proche de 1 et son intensité diffusée en DLS est très faible, proche de 50 kcps (Tableau 5, Figure 56). Pour l'ensemble des milieux, les intensités diffusées sont bien inférieures à celles de nanoparticules (Tableau 5), et les lignes de base des courbes d'autocorrélations sont supérieures à celles des PSL de 200 nm (Figure 56). Cela signifie que la concentration en colloïdes dans les milieux est faible par rapport aux concentrations étudiées des plastiques nanométriques (1-100 ppm) et qu'elle ne devrait pas perturber les mesures de cinétique d'agrégation.

Tableau 5: Intensités diffusées par les milieux comparées avec celles des dispersions de PSL et PS-ref.

Milieu	Intensité diffusée (kcps)	Puissance du laser (%)
Eau	50	100
NaCl (30g/l)	28	100
Milieu Dauta	47	100
Milieu F/2	52	100
Edm (0.4µm)	91	100
Edm (0.8µm)	296	100
PSL 200nm (20ppm)	2535	40
PS-ref (11ppm)	2402	40
PS-ref (1ppm)	2431	75

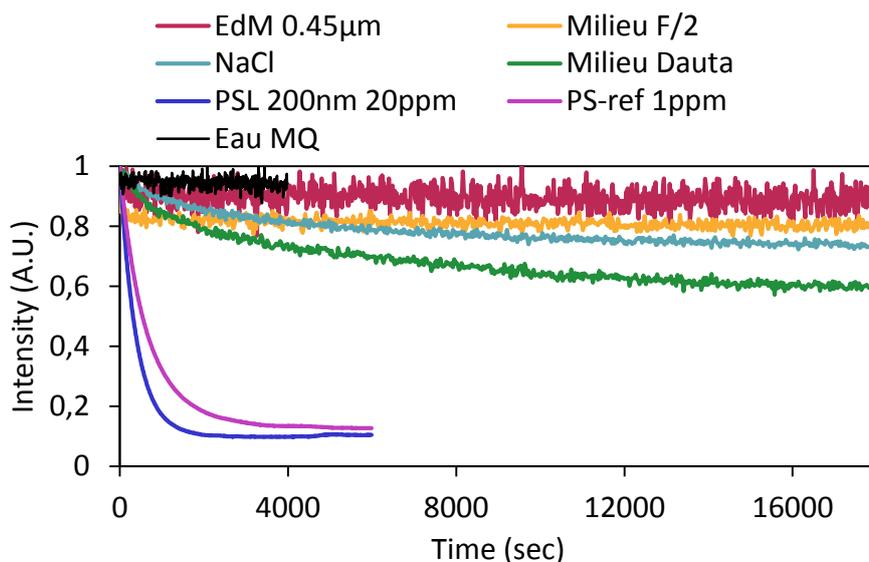


Figure 56: Courbes d'autocorrélation des PSL et PS-ref dispersés dans de l'eau ultra-pure (concentrations de 20ppm et 1ppm respectivement), de solutions de NaCl (30g/l), d'Eau de mer artificielle (30g/l) filtrée à 0,45 µm, du milieu Dauta et du milieu F/2. Les lignes de bases proches de 1 indiquent une très faible concentration en particule.

L'eau de mer artificielle filtrée avec un filtre de 0,8 µm de pore diffuse une quantité de lumière non négligeable et a une ligne de base plus proche de celle des PSL, ce qui signifie la présence de nanoparticule dans la solution. Après filtration sur 0,45 µm la solution se retrouve exempte de nanoparticule et permet une mesure sans biais, des cinétiques d'agrégation des plastiques nanométriques (Figure 57).

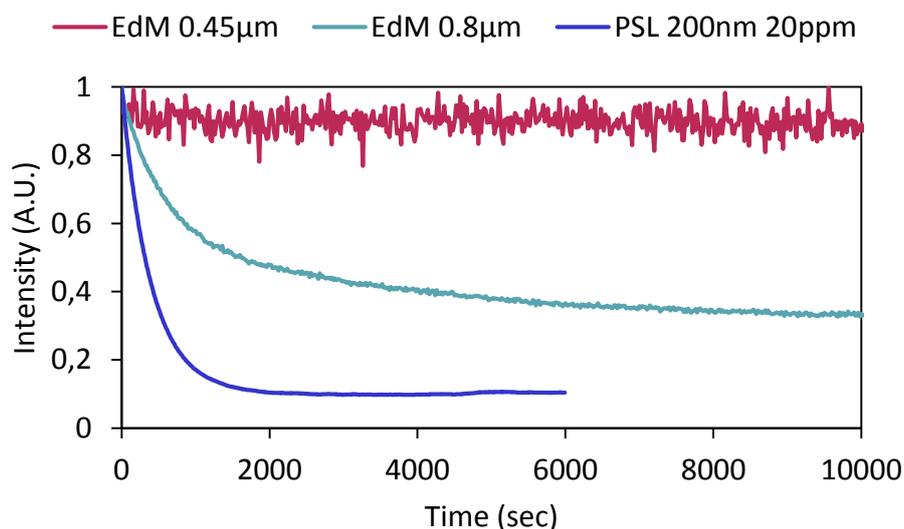


Figure 57 : Courbes d'autocorrélation d'eau de mer artificielle (30g/l) filtrée sur un filtre de pore 0,8µm ou 0,45µm. Des colloïdes sont présent dans la solution filtrée à 0,8µm mais pas lorsqu'elle est filtrée à 0,45µm.

III.2.1 Relargage de NP par le canal

Afin de vérifier que le micro-canal ne relarguait pas de NP pouvant perturber ou biaiser les mesures de cinétiques d'agrégation, de l'eau ultra pure ainsi une dispersion de PSL 200nm ont été analysés en utilisant la LIBD.

Le chapitre 4 détaille le protocole de mesure de la LIBD ainsi que le principe de la LIBD.

La Figure 58A montre les courbes en S d'eau ultra pure ayant circulé ou non dans la micropuce. Le seuil de la courbe en S de l'eau de la micropuce est légèrement supérieur (192 μJ) à celui de l'eau qui est de 208 μJ , ce qui permet de calculer une pente, qui est très faible ($0,00097 \mu\text{J}^{-1}$). Le seuil est largement supérieur à 35 μJ , seuil des PSL de 20 nm, ce qui montre que les particules détectées ont une taille très inférieure à 20 nm. Cela signifie qu'il y a une très faible quantité de nanoparticules de petite taille qui sont relarguées par le canal de microfluidique. Ces petites nanoparticules ne perturberont donc pas le signal émis par des PSL de 200 nm en DLS, car ils ne perturbent pas les résultats obtenus en LIBD montrés en Figure 58B.

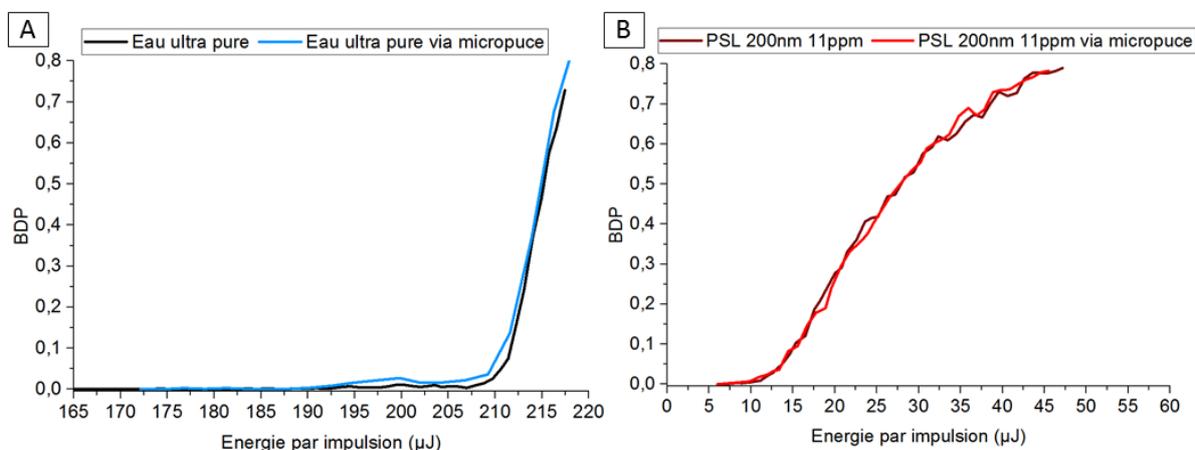


Figure 58 : A : courbes en S d'eau ultra pure comparée à de l'eau ultra pure ayant circulée dans la puce de microfluidique. B : courbes en S de PSL 200nm à la concentration de 11ppm comparée à la même dispersion ayant circulée dans la puce de microfluidique.

III.2.1 Influence de la force ionique

III.2.1.1 Expérimentations en Batch

Afin de vérifier que les nanoparticules de plastiques se comportent selon la théorie DLVO, elles sont été dispersées dans des milieux de différentes forces ioniques comme le NaCl (présenté dans la section III.1), l'eau de mer artificielle et les milieux de culture d'algue : le milieu F/2 et le milieu Dauta. Les vitesses d'agrégation ont été mesurées dans la partie linéaire des courbes (15 premières minutes) et sont répertoriées dans le Tableau 24 en Annexe III.

Il est possible de comparer les cinétiques d'agrégation de différentes particules si elles ont la même concentration particulaire. Si celle-ci est aisément calculée à partir de la concentration massique et de la densité pour les PSL qui sont sphériques et monodispersées, il est plus délicat d'obtenir une valeur précise avec des PS-ref qui ont des formes aléatoires et une plus large distribution en taille. Pour une concentration massique de 11 ppm, nous obtenons une concentration particulaire de $2,50 \cdot 10^9 \text{ part mL}^{-1}$ pour des PSL de 200 nm de diamètre et $5,09 \cdot 10^8 \text{ part mL}^{-1}$ pour les PSL free soap de 345 nm. Si nous faisons l'approximation que les

PS-ref sont composés de deux populations de particule sphériques de 180 et 450 nm, la concentration particulaire devrait se trouver entre $2,20 \cdot 10^8$ et $3,43 \cdot 10^9$ part mL⁻¹. Les concentrations particulaires des PSL et PS-ref étant du même ordre de grandeur, nous considérerons que leurs concentrations massiques seront équivalentes et comparables.

Lorsqu'on compare le comportement d'agrégation des PSL dans les différents milieux, ils ont tendance à s'agréger plus rapidement dans le milieu F/2 ($3,7 \text{ nm min}^{-1}$) (1 ppm), que dans la solution de NaCl à 30 g L^{-1} ($1,514 \text{ nm min}^{-1}$) à 2 ppm (**Figure 102A et B** en Annexe III). Les PS-ref suivent la même tendance dans l'eau de mer artificielle, quand ils sont à la concentration de 11 ppm, avec une pente de $21,3 \text{ nm min}^{-1}$; contre $15,4 \text{ nm min}^{-1}$ dans la solution de NaCl (30 g L^{-1}) (**Figure 106** en Annexe III). Ceci est dû à la présence d'ions divalent (Mg^{2+} , Ca^{2+}) dans l'eau de mer (naturelle ou artificielle), qui neutralisent plus efficacement la charge de surface des particules et entraînent une agrégation plus rapide. En revanche, quand les PS-ref sont à la concentration de 1 ppm, ils s'agrègent plus rapidement dans la solution de NaCl à 30 g L^{-1} ($15,8 \text{ nm min}^{-1}$) que dans l'eau de mer artificielle ($7,6 \text{ nm min}^{-1}$) ou dans le milieu F/2 ($13,4 \text{ nm min}^{-1}$) (Figure 105 et Figure 106 en Annexe III). Du fait que l'on soit au-dessus de la CCC des PS-ref dans les 3 milieux, les particules ont atteint leur vitesse maximum d'agrégation. La variabilité dans les pentes obtenues est en fait causée par la polydispersité de la dispersion mère et de la proportion différente des classes de taille dans chaque échantillon.

Si l'on compare les cinétiques d'agrégation des PSL et des PS-ref à la même concentration en particule (1 ppm) dans le milieu F/2, les PS-ref s'agrègent légèrement plus rapidement ($13,4 \text{ nm min}^{-1}$) que les PSL ($3,7 \text{ nm min}^{-1}$) (Figure 105 en Annexe III). Le fait que les agrégats de PS-ref grandissent plus vite que ceux des PSL, peut être expliqué par leur plus large distribution en taille (Petosa et al., 2010).

Le diamètre des PSL-COOH reste égal à leur diamètre initial pendant les 110 min de mesure, et ce, aux différentes concentrations en NaCl jusqu'à 60 g L^{-1} ($1\,027 \text{ mM}$) (Figure 103 en Annexe III). Ces nanoparticules sont également stables dans l'eau de mer artificielle et dans le milieu de culture F/2 même à forte concentration en particule (100 ppm). Les PSL-COOH free soap sont aussi stables dans l'eau de mer artificielle et dans le milieu F/2 pendant les 4 jours de mesure à la concentration de 1 ppm. La charge de surface des PSL-COOH et des PSL-COOH free soap n'est pas totalement annulée même à de fortes concentrations en sel car les fonctions $-\text{COO}^-$ anioniques maintiennent une charge négative qui repousse les particules les unes des autres. Ceci est confirmé par la valeur du potentiel Zeta très négatif (-42 mV).

Dans le milieu Dauta les PSL, PS-ref, et PSL-COOH free soap restent stables pendant 4 jours à la concentration de 1 ppm (Figure 104 en Annexe III). Les PSL quant à eux, ont un Z-average qui passe de 221 nm à 350 nm au bout de 5 jours, à la concentration de 1 ppm. Cette stabilité peut être expliquée par la faible force ionique du milieu, largement en dessous de la CCC des particules étudiées.

La stabilité des NPG (11 ppm) a été étudiée dans des solutions de NaCl ($20\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$) et de l'eau de mer artificielle, mais le lot utilisé les jours des expérimentations n'a pas montré de signe d'agrégation, malgré plusieurs réplicas. Les contraintes techniques et temporelles n'ont pas permis de réitérer les expérimentations avec un nouveau lot.

III.2.1.2 Expérimentations dans un gradient de salinité

Les PS-ref (11ppm) dispersés dans un gradient d'eau de mer artificielle à 2ml h⁻¹ ont le même comportement que dans un gradient de NaCl (décrit dans la section III.1). Il n'y a pas d'agrégation dans le flacon de la sortie Aout, et il y a une légère agrégation dans le flacon de la sortie Bout, le diamètre hydrodynamique moyen augmentant d'un facteur 2,5 (100 minutes après passage dans micropuce) (Figure 107 en Annexe II). La taille moyenne finale des agrégats est similaire à celle obtenues dans le gradient de NaCl, car nous sommes bien au-dessus de la CCC.

Les NPG (11ppm) ont un comportement d'agrégation relativement similaire à ceux des PS-ref. En effet, il y a une légère agrégation dans le flacon de la sortie Aout, (facteur 1,6 ; 100 minutes après passage dans la micropuce), et une agrégation plus marquée dans la sortie Bout avec un diamètre hydrodynamique moyen de 2300 ± 800 nm (facteur de 7,6 ; 100 min minutes après passage dans la micropuce) (Figure 107 en Annexe II).

IV Conclusion

Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques des différents modèles de nanoparticules de plastique avec les nanoplastiques environnementaux

	PSL	PSL-COOH	PSL-free soap	PS-ref Issus de plastiques primaires	NPG Issus de plastiques secondaires	Échantillon environ- nemental
Taille	20 à 900 nm	20 à 900 nm	<400 nm	< 500µm	< 1µm	< 1µm
Morphologie	Sphérique	Sphérique	Sphérique	Irrégulière	Irrégulière	Irrégulière
Distribution en taille	Monodispersé	Monodispersé	Monodispersé	Continuum de taille	Continuum de taille	Continuum de taille
Composition	PS	PS	PS	PS	Mélange de plastiques	Mélange de plastiques
Formulation	Inconnue	Inconnue	Contrôlée	Granulés industriels		
État de surface	Sans fonctions	-COOH (non quantifié, non ajustable)	-COOH (quantifiable, ajustable)	Légèrement oxydée par dégradation mécanique	Oxydée	Oxydée
Additifs (surfactants et biocide)	Oui (formulation inconnue)	Oui (formulation inconnue)	Non	Non	Non	Non
Stabilité (Solution de NaCl à 30g/l)	++	+++	+++	+	+	?

Dans ce chapitre nous avons vu que les caractéristiques physicochimiques et morphologiques des nanoparticules déterminent leur comportement d'agrégation. Nous avons comparé plusieurs

types de nanoparticules qui ont des caractéristiques plus ou moins proches des nanoplastiques que l'on peut trouver dans l'environnement résumées dans le **Tableau 6**. Les latex de polystyrène sont clairement les plus éloignés des échantillons environnementaux de par leur forme sphérique, la présence d'additif et la distribution monodispersée. Néanmoins il est possible de les rapprocher des nanoplastiques en utilisant des PSL dont la synthèse est contrôlée, avec une surface oxydée par des fonctions -COOH en concentration connue, et sans ajout d'additifs.

Le modèle le plus adapté pour représenter les nanoplastiques serait évidemment les nanoplastiques prélevés dans l'environnement. Néanmoins le prélèvement et l'extraction et l'analyse des échantillons environnementaux sont des étapes délicates et se heurtent à des limites techniques et analytiques. Les modèles préparés en laboratoire seront donc une alternative plus simple et permettant un meilleur contrôle des caractéristiques physicochimiques et morphologiques des nanoparticules. Le modèle le plus adapté va dépendre du domaine d'étude.

En effet, pour les études physico-chimiques les modèles les plus adaptés seront les NPG ou bien les PS-ref et car ils sont représentatifs des particules environnementales par leur forme, leur distribution en taille, leur absence de surfactant, et leur surface oxydée. Les NPG sont les plus représentatifs car issus de plastiques secondaires. Ils ont une morphologie et des caractéristiques et physicochimiques de surface proches des nanoplastiques comme une forte oxydation de surface, une forme irrégulière, poreuse et fractale et éventuellement de la matière organique et des polluants adsorbés en surface. Les PS-ref, même si moins représentatifs, permettent un meilleur contrôle des caractéristiques des particules car le type de polymère est connu et unique, ils ont l'avantage de ne contenir aucun colorant ni aucune substance inconnue provenant de l'environnement. Il est toutefois possible de ne préparer des NPG qu'avec des polymères identifiés au préalable. Les PS-ref et NPG sont adaptés pour étudier le comportement d'agrégation, l'étude de sorption de polluant, l'interaction avec la matière organique, le transport dans les milieux ou aux interfaces (colonne d'eau, zone de transition eau douce/eau de mer, sols, aquifères, glaces polaires...).

Dans le cas des études écotoxicologiques, les PSL issus du commerce ne sont pas recommandés en particulier à cause de la présence d'additifs de composition inconnue potentiellement toxiques pour les organismes qui peuvent biaiser les résultats, et des fonctions de surface non contrôlables. Les PS-ref et les NPG ont une forme irrégulière, et ne contiennent pas d'additifs toxiques. Les NPG permettent de faire une exposition réaliste car ils ont potentiellement des polluants (polluants organiques persistants, métaux traces) et de la matière organique adsorbés à leur surface. Néanmoins la qualification et la quantification exacte des polluants et de la matière organique peut s'avérer délicate, et il faudra alors se tourner vers les PS-ref pour mieux contrôler les paramètres de surface des particules. Il est aussi possible de les incuber avec des polluants connus, afin de contrôler les types et la quantité des polluants adsorbés et pouvoir éventuellement étudier des effets cocktails. La polydispersité des PS-ref rend la détermination de la distribution en taille peu précise surtout dans le cas où les particules s'agrègent dans le milieu. La taille étant un facteur très important dans la biodisponibilité et les mécanismes d'entrée et de toxicité, les écotoxicologues voudront peut être se tourner vers des nanoplastiques modèles ayant une distribution monodispersée, de préférence stables dans le milieu, dans le cas où ils veulent uniquement étudier l'effet de la taille des particules. Il est alors préférable

d'utiliser les PSL-COOH free soap, dont la taille et la quantité de fonctions –COOH sont contrôlable et qui ne contiennent pas d'additifs toxiques. L'avantage par rapport aux autres PSL est aussi que les fonctions –COOH les rapprochent des surfaces oxydées des nanoplastiques, contrairement aux PSL sans fonctions ou aux PSL aminés (-NH₂).

Nous avons également montré dans ce chapitre, que le mode de dispersion des nanoparticules de plastiques influence leur comportement d'agrégation. Le passage des nanoparticules dans un gradient de salinité agirait comme un filtre provoquant l'agrégation de la majorité des particules mais aussi laissant passer des particules rendues stables par la dilution. Il est probable que ces agrégats stables entraînent des effets toxiques sur les organismes qui sont différents des particules de plastiques dispersés selon les protocoles traditionnels. C'est ce qui va être déterminé dans le chapitre suivant.

V Bibliographie

- Abécassis, B., Cottin-Bizonne, C., Ybert, C., Ajdari, A., Bocquet, L., 2008. Boosting migration of large particles by solute contrasts. *Nat. Mater.* 7, 785–789. <https://doi.org/10.1038/nmat2254>
- Baalousha, M., Nur, Y., Römer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 454–455, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.093>
- Blanco, F., n.d. No Title.
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 309, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.074>
- Dauta, A., 1982. Conditions de développement du phytoplancton. Étude comparative du comportement de huit espèces en culture. II rôle des nutriments: assimilation et stockage intracellulaire. *Int. J. Limnol.* 18, 263–292. <https://doi.org/10.1051/limn/1982014>
- Davranche, M., Veclin, C., Pierson-Wickmann, A.C., El Hadri, H., Grassl, B., Roweczyk, L., Dia, A., Ter Halle, A., Blanco, F., Reynaud, S., Gigault, J., 2019. Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. *Environ. Pollut.* 249, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.087>
- Dersoir, B., de Saint Vincent, M.R., Abkarian, M., Tabuteau, H., 2015. Clogging of a single pore by colloidal particles. *Microfluid. Nanofluidics* 19, 953–961. <https://doi.org/10.1007/s10404-015-1624-y>
- Ebel, J.P., Anderson, J.L., Prieve, D.C., 1988. Diffusiophoresis of Latex Particles in Electrolyte Gradients. *Langmuir* 4, 396–406. <https://doi.org/10.1021/la00080a024>
- Einstein, A., 1956. *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Courier Corporation.
- El Hadri, H., Gigault, J., Maxit, B., Grassl, B., Reynaud, S., 2020. Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments. *NanoImpact* 17, 100206. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100206>
- Eriksen, M., Thiel, M., Lebreton, L., 2019. Nature of Plastic Marine Pollution in the Subtropical Gyres BT - Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment, in: Takada, H., Karapanagioti, H.K. (Eds.), *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment*. Springer International Publishing, Cham, pp. 135–162. https://doi.org/10.1007/978-94-007-698-2_123
- Ferreira, I., Venâncio, C., Lopes, I., Oliveira, M., 2019. Nanoplastics and marine organisms: What has been studied? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 67, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.006>
- Filella, M., 2006. *Colloidal Properties of Submicron Particles in Natural Waters*. *Environ. Colloids Part.*, Wiley Online Books. <https://doi.org/doi:10.1002/9780470024539.ch2>
- Frisken, B.J., 2001. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Opt.* 40, 4087–4091. <https://doi.org/10.1364/ao.40.004087>
- Gigault, J., Balaesque, M., Tabuteau, H., 2018a. Estuary-on-a-chip: Unexpected results for the fate and transport of nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 5, 1231–1236. <https://doi.org/10.1039/c8en00184g>
- Gigault, J., Balaesque, M., Tabuteau, H., 2018b. Estuary-on-a-chip: Unexpected results for the fate and transport of nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 5, 1231–1236. <https://doi.org/10.1039/c8en00184g>
- Gigault, J., Budzinski, H., 2016. Selection of an appropriate aqueous nano-fullerene (nC60) preparation protocol for studying its environmental fate and behavior. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.019>
- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.Y., Gauffre, F., Phi, T.L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018c. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.Y., Gauffre, F., Phi, T.L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018d. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci. Nano* 3, 346–350. <https://doi.org/10.1039/C6EN00008H>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Cult. Mar. Invertebr. Anim.* 29–60.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and

- Detonula confervacea Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M., 2019. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* 53, 1039–1047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>
- Hassan, P.A., Rana, S., Verma, G., 2015. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* 31, 3–12. <https://doi.org/10.1021/la501789z>
- Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles 344–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0225-x>
- Koelmans, A.A., 2019. Proxies for nanoplastic. *Nat. Nanotechnol.* 14, 307–308. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0416-z>
- 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, pp. 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Koppel, D.E., 1972. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *J. Chem. Phys.* 57, 4814–4820. <https://doi.org/10.1063/1.1678153>
- Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science* (80-.). 329, 1185–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1192321>
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., Meakin, P., 1989. Universality in colloid aggregation. *Nature* 339, 360–362. <https://doi.org/10.1038/339360a0>
- Mao, Y., Li, H., Huangfu, X., Liu, Y., He, Q., 2020. Nanoplastics display strong stability in aqueous environments: Insights from aggregation behaviour and theoretical calculations. *Environ. Pollut.* 258, 113760. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113760>
- Martin, C., Almahsheer, H., Duarte, C.M., 2019. Mangrove forests as traps for marine litter. *Environ. Pollut.* 247, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.067>
- Mie, G., 1908. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 330, 377–445.
- Mitrano, D.M., Beltzung, A., Frehland, S., Schmiedgruber, M., Cingolani, A., Schmidt, F., 2019. Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems. *Nat. Nanotechnol.* 14, 362–368. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0360-3>
- Mohammed, A., Farrell, A.D., Gobin, J., Agard, J.B., 2014. Effects of freshwater flooding on mangroves in the Caribbean Region, in: *Flooding and Climate Change: Sectorial Impacts and Adaptation Strategies for the Caribbean Region*. Nova Publisher, pp. 73–96.
- Nyeo, S.L., Ansari, R.R., 2011. Sparse Bayesian learning for the Laplace transform inversion in dynamic light scattering. *J. Comput. Appl. Math.* 235, 2861–2872. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2010.12.008>
- Pessoni, L., Veclin, C., El Hadri, H., Cugnet, C., Davranche, M., Pierson-Wickmann, A.C., Gigault, J., Grassl, B., Reynaud, S., 2019. Soap- and metal-free polystyrene latex particles as a nanoplastic model. *Environ. Sci. Nano* 6, 2253–2258. <https://doi.org/10.1039/c9en00384c>
- Petosa, A.R., Jaisi, D.P., Quevedo, I.R., Elimelech, M., Tufenkji, N., 2010. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6532–6549. <https://doi.org/10.1021/es100598h>
- Pikuda, O., Xu, E.G., Berk, D., Tufenkji, N., 2019. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6, 21–25. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00614>
- Schmidt, C., Krauth, T., Wagner, S., 2017. Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12246–12253. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02368>
- Shams, M., Alam, I., Chowdhury, I., 2020. Aggregation and stability of nanoscale plastics in aquatic environment. *Water Res.* 171, 115401. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115401>
- Smoluchowski, M. V, 1917. An experiment on mathematical theorization of coagulation kinetics of the colloidal solutions. *Zeitschrift fur Phys. Chemie* 92, 129–168.
- Squires, T.M., Quake, S.R., 2005. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* 77, 977–1026. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>
- Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R., 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* 8, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>

- Stone, H.A., Stroock, A.D., Ajdari, A., 2004. Engineering Flows in Small Devices. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 36, 381–411. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124>
- Taltec, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A., Paul-Pont, I., 2019. Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere* 225, 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077>
- Tang, S., Preece, J.M., McFarlane, C.M., Zhang, Z., 2000. Fractal morphology and breakage of DLCA and RLCA aggregates. *J. Colloid Interface Sci.* 221, 114–123. <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6565>
- Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13689–13697. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>
- Tipping, M.E., 2001. Sparse Bayesian Learning and the Relevance Vector Machine. *J. Mach. Learn. Res.* 1, 211–244. <https://doi.org/10.1162/15324430152748236>
- Wan, J.-K., Chu, W.-L., Kok, Y.-Y., Lee, C.-S., 2018. Distribution of Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Ecosystems and Their Impacts on Aquatic Organisms, with Emphasis on Microalgae, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer. https://doi.org/10.1007/398_2018_14
- Weibel, D.B., DiLuzio, W.R., Whitesides, G.M., 2007. Microfabrication meets microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 209–218. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1616>
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wyatt, P.J., 1993. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* 272, 1–40. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80373-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80373-S)
- Zhang, W., Crittenden, J., Li, K., Chen, Y., 2012. Attachment efficiency of nanoparticle aggregation in aqueous dispersions: Modeling and experimental validation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7054–7062. <https://doi.org/10.1021/es203623z>

CHAPITRE 3 : Impact écotoxicologique de nanoparticules de plastique sur les huîtres de Guadeloupe

I Introduction

Nous avons vu que le comportement des nanoplastiques modèles était différent de celui des PSL et que le gradient de salinité avait un effet important sur leur stabilité. Comme il a été expliqué dans le chapitre 1, le comportement d'agrégation des NP a une influence directe sur leurs biodisponibilités, leurs toxicités et leurs mécanismes d'action. Nous avons donc voulu étudier la toxicité (i) des nanoplastiques modèles par rapport aux PSL (ii) d'une dispersion des NP dans un gradient de salinité en mode dynamique.

II Démarche expérimentale

Pour évaluer l'impact toxique des nanoplastiques modèles une exposition directe a été réalisée sur des huîtres de palétuvier. Pour cela, les nanoparticules ont été dispersés au préalable dans un gradient de salinité en mode dynamique selon les mêmes conditions qu'indiquées dans le chapitre précédent. Les nanoplastiques de référence sont préalablement dispersés dans de l'eau ultra-pure et injecté dans l'entrée A_{in} de la puce de microfluidique, tandis que de l'eau de mer artificielle (30g/L) est injectée dans l'entrée B_{in} , avec un débit égal de 2mL h^{-1} .

Deux protocoles ont été utilisés, le premier sera présenté sous forme d'article (encore en cours de préparation) et consiste à plonger les deux sorties de la micropuce dans le milieu d'exposition (Protocole A, **Figure 59A**). Le deuxième consiste à ne plonger que la sortie la plus salée i.e. B_{out} (**Figure 59B**) dans le milieu. Les résultats du deuxième protocole sont présentés en Annexe V.

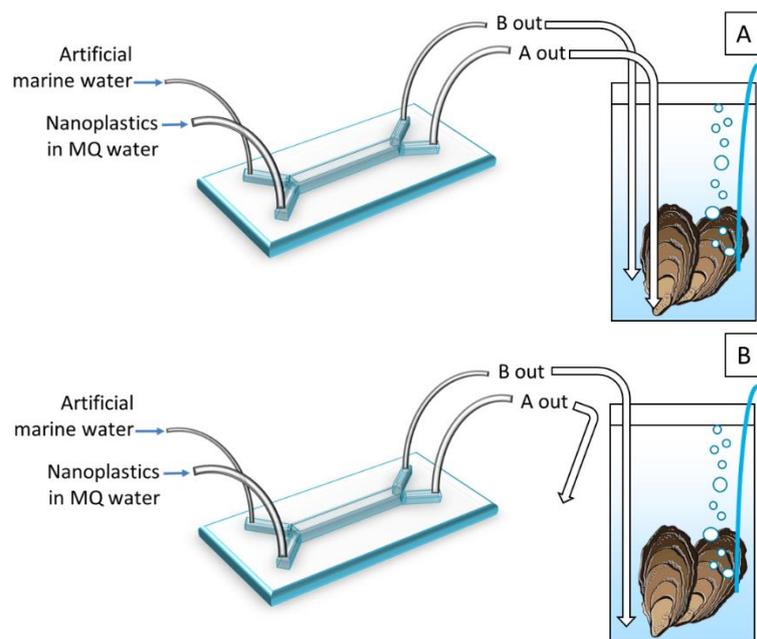


Figure 59 : Schéma des protocoles d'exposition des huîtres des palétoyeurs aux nanoplastiques modèles en mode dynamique. A : Protocole A : les deux sorties de la micropuce dans le bocal. B : Protocole B : uniquement la sortie Bout dans le bocal.

Le **Tableau 7** résume les conditions d'exposition des huîtres selon les deux protocoles. La condition témoin consistait à l'injection d'eau MQ (contenant 6% d'éthanol résiduel, ou non, en fonction des nanoplastiques modèles utilisés), ayant circulé dans le canal de microfluidique dans les mêmes conditions que les dispersions de nanoparticules de plastique. Les concentrations en nanoparticules de plastiques ont été choisies dans la gamme du $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) pour se rapprocher des concentrations environnementales (Besseling et al., 2017b; Lenz et al., 2016).

Tableau 7 : Conditions d'expositions des protocoles A (les deux sorties de la micropuce dans le bocal) et B (uniquement la sortie B)

	Protocole A				Protocole B		
	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3
PS-Ref	4 ppb*	37 ppb*	222 ppb*	333 ppb*	3 ppb	13 ppb	25 ppb
NPG	1 ppb*	15 ppb*	44 ppb*	133 ppb*	3 ppb	13 ppb	25 ppb
PSL-COOH	0,34 ppb	1 ppb	-	-	-	-	-
PSL-COOH free soap	-	-	-	-	3 ppb	13 ppb	25 ppb
Injection de NP	1, à T0				2, à T0 et T3		
Nombre d'huîtres par bocal	4				2		
Nombre de répliques par conditions	4				3		
Nombre de répliques individuels (pool de 2 huîtres)	2				1		

*contient 6% d'éthanol résiduel.

Afin d'évaluer l'impact de l'exposition directe aux nanoparticules de plastique sur les huîtres, il a été choisi de mesurer la réponse précoce de gènes représentatifs de fonctions cellulaires clef. Pour cela nous avons utilisé la technique de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) qui permet de connaître la concentration initiale en ARN d'intérêt dans les tissus des huîtres.

II.1 Huître des palétuviers

Les bivalves sont des organismes régulièrement utilisés comme bio-indicateurs car ils sont en permanence dans la colonne d'eau et filtrent activement les matières en suspension pour respirer et se nourrir. De plus, ils ont une grande capacité à bioaccumuler les polluants qui sont en faible concentration dans l'eau (Arini et al., 2014; Baudrimont et al., 2005). Dans cette étude, nous nous avons choisi un bivalve fréquemment retrouvé dans les mangroves et mers tropicales autour du globe, notamment dans les mangroves de Guadeloupe, plutôt que d'utiliser des organismes modèles de laboratoires souvent éloignés des organismes endémiques des régions étudiées (daphnies, poissons zèbres, medaka japonais, phytoplancton *Scenedesmus* sp...). Il s'agit de l'huître des palétuviers *Isognomon alatus* qui représente un modèle de choix dans ces environnements pour étudier l'effet des nanoplastiques.



Figure 60 : Huîtres *I. alatus* sur des racines de palétuviers dans une mangrove de Guadeloupe

II.2 Gènes d'intérêt

Les gènes d'intérêt correspondant à 5 grandes fonctions biologiques ont été sélectionnés et sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Nom et fonction des gènes d'intérêt sélectionnés

Gène	Nom	Rôles
<i>β-actine</i>	Beta actine	Gene de référence
<i>RPL7</i>	Protéine Ribosomale L7	Gene de référence
<i>cltc</i>	Chaine lourde de clathrine	Endocytose
<i>cav</i>	Cavéoline	Endocytose
<i>cox1</i>	Cytochrome C oxidase sous unité 1	Métabolisme mitochondrial
<i>12s</i>	ARNr mitochondrial 12s	Métabolisme mitochondrial
<i>cat</i>	Catalase	Stress oxydant
<i>sod1</i>	Superoxide dismutase 1	Stress oxydant

<i>gadd45</i>	Growth arrest and DNA Damage	Réparation de l'ADN
<i>p53</i>	Suppresseur de tumeur p53	Arrêt du cycle cellulaire, réparation de l'ADN, apoptose
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogénase	Stress Oxydant, Réparation De l'ADN, Apoptose
<i>bax</i>	BCL2	Apoptose
<i>mdr</i>	ATP Binding Cassette (Sous Famille)	Détoxication

Deux gènes constitutifs, β -actine et *rpl7*, servent de référence pour calculer les expressions relatives des autres gènes car ils sont exprimés de manière similaire et constante dans tous les tissus de l'organisme. Deux gènes représentent les fonctions d'endocytose : la chaîne lourde de la clathrine et la cavéoline comme illustré en **figure 61**. Ces protéines membranaires permettent de former des vésicules d'endocytose et d'internaliser des objets de 100-120nm pour les vésicules de clathrine et de 60 à 80 nm pour les vésicules de cavéoline (Kou et al., 2013). Les nanoparticules anioniques peuvent interagir facilement avec les charges positives des protéines membranaires, et sont le plus souvent internalisées par le système à cavéoline, même s'il y a quelques exceptions (dont les nanoparticules de PLGA (acide poly (lactique-co-glycolique)) (Kou et al., 2013).

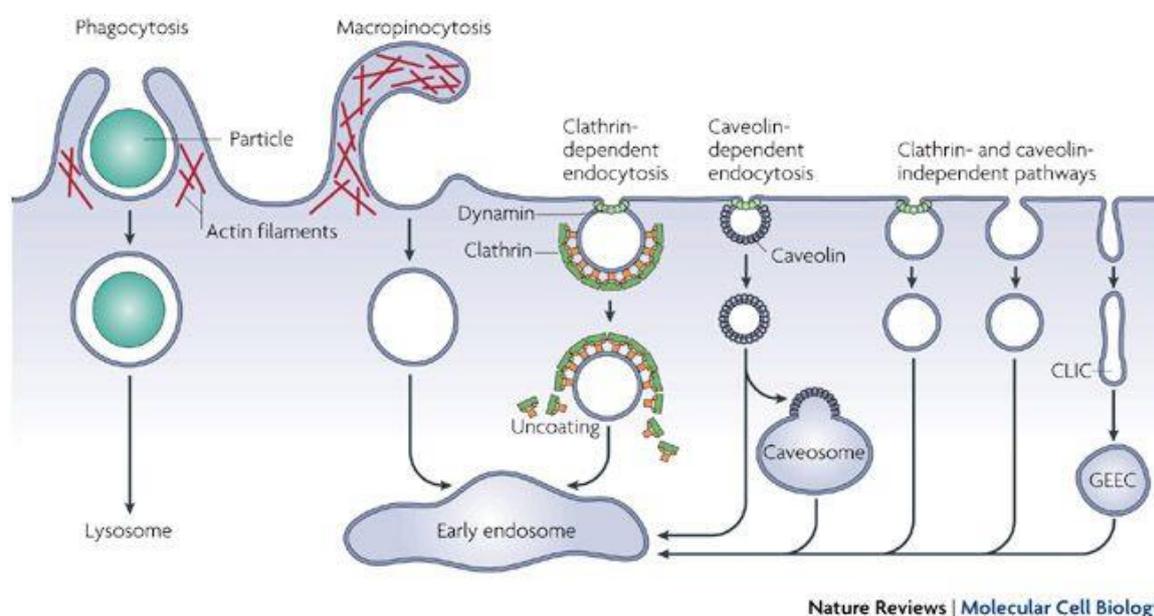


Figure 61 : Schéma des différentes voies d'endocytose de la cellule (Mayor and Pagano, 2007)

Le stress oxydant est représenté par l'expression des gènes codant pour les enzymes super oxyde dismutase (*sod1*) cytosolique qui dismute les ions superoxydes en O_2 et H_2O_2 , et la catalase (*cat*) qui transforme le H_2O_2 en O_2 et H_2O (**Figure 62**)

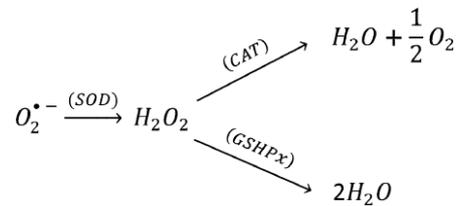


Figure 62: Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase.

Le gène *gapdh* qui code pour la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase est initialement engagé dans la gestion de l'énergie par les réactions de glycolyse et de néoglucogénese. Ce gène est impliqué dans beaucoup de fonctions cellulaires dont le stress oxydant (Figure 65) (Colell et al., 2009; Ralser et al., 2007; Sirover, 2011; Tristan et al., 2011).

Deux gènes représentent le métabolisme mitochondrial. Le gène *cox1* codant pour la sous unité 1 de la Cytochrome C oxydase, présente dans le complexe IV (complexe IV) de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 63). Ce gène représente l'activité respiratoire de la mitochondrie, il doit être normalisé par l'expression du gène *12s* qui représente la quantité de mitochondries dans la cellule (Arini et al., 2015).

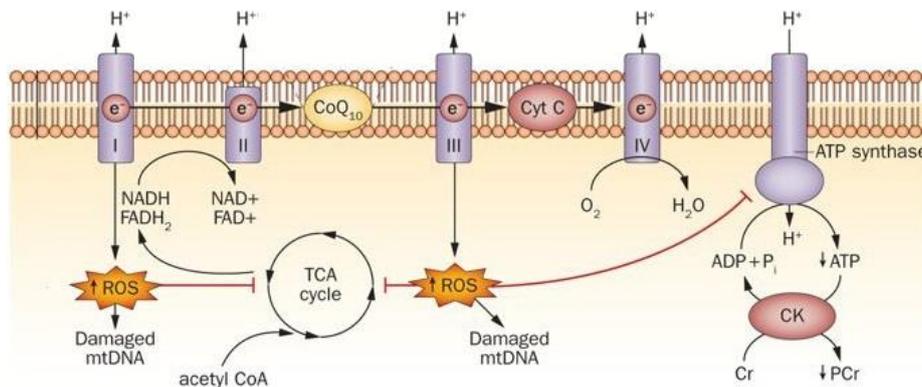


Figure 63: Chaîne respiratoire mitochondriale et stress oxydant (Okonko and Shah, 2015)

Les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire présentent plusieurs fonctions. *p53* (gène suppresseur de tumeur) est impliqué dans de nombreux processus (sénescence, autophagie, métabolisme, angiogénèse, migration, métastase, Figure 64) (Reed and Quelle, 2014). Il induit notamment *gadd45* pour arrêter le cycle cellulaire afin de réparer l'ADN et *bax* pour déclencher l'apoptose (Reed and Quelle, 2014). *Gapdh* est impliqué dans l'induction de l'apoptose selon plusieurs voies dont une chaîne de réaction qui peut induire *p53* (Figure 65) (Colell et al., 2009; Nicholls et al., 2012; Tristan et al., 2011). *p53* régule aussi *gapdh* car une diminution de la protéine *p53* diminue l'expression de *gapdh* et la stabilisation de *p53* augmente l'expression de *gapdh* (Nicholls et al., 2012).

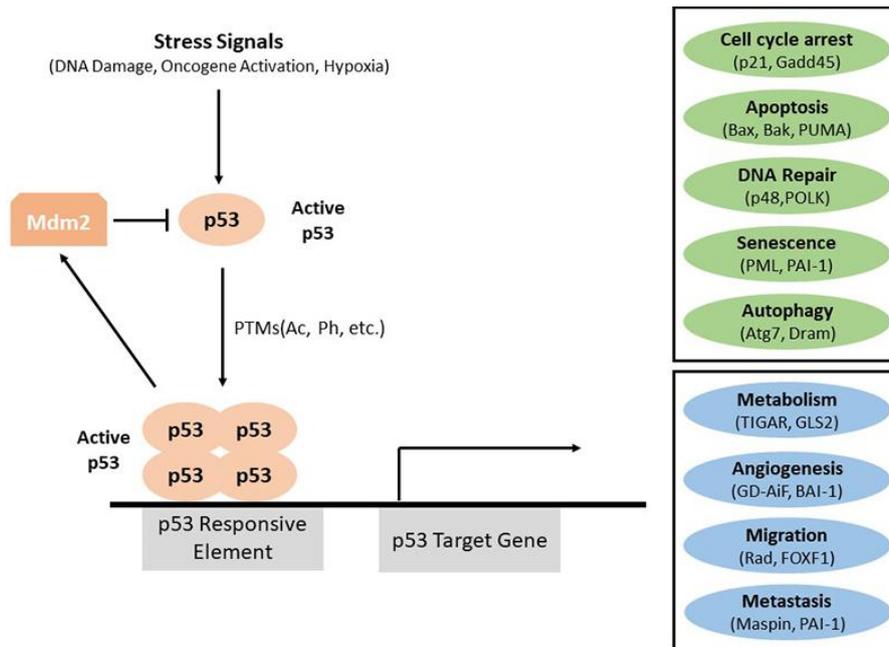


Figure 64 : Implication de la protéine p53 dans l'activation de gènes impliqués dans plusieurs fonctions en réaction à un stress cellulaire (Reed and Quelle, 2014).

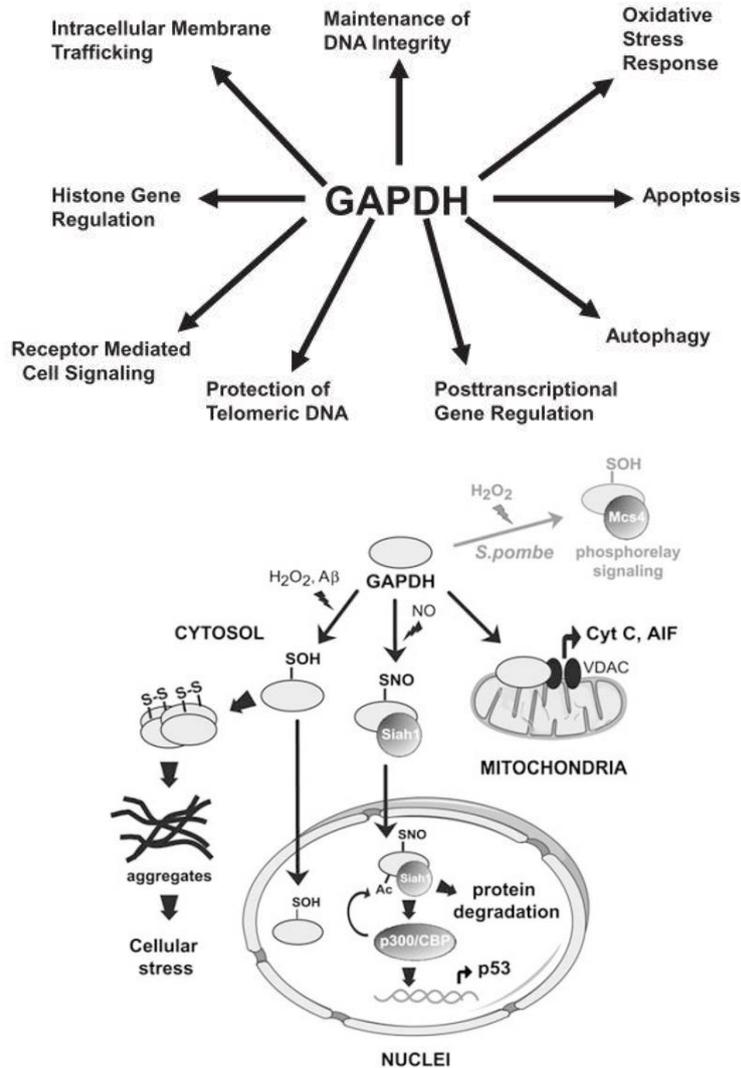


Figure 65 : Implication du gène *gapdh* dans plusieurs fonctions cellulaires (Sirover, 2011), et dans l'activation du gène de *p53* ou la libération de protéines pro-apoptotiques depuis la mitochondrie en réaction à des contaminants oxydants (H_2O_2 , $A\beta$) (Colell et al., 2009; Sirover, 2011).

Voici le résumé des relations qui seront utiles pour interpréter les données des qPCR :

- $p53 \rightarrow gadd45 \rightarrow$ arrêt cycle cellulaire/ réparation de l'ADN
- Stress oxydant/ atteintes à l'ADN $\rightarrow gapdh$
- $gapdh \rightarrow p53 \rightarrow bax \rightarrow$ apoptose

La dernière fonction représentée est la détoxification cellulaire avec le gène *abcb1*, aussi appelé *mdr* (*multi-drug resistance*). Ce gène code pour une protéine membranaire la glycoprotéines P 1 de la famille des transporteurs *ATP binding cassette* (ABC) qui permet l'expulsion des xénobiotiques (pompe ATPase) (Achard et al., 2004).

III Exposure of mangrove oysters to nanoplastics through a microfluidic salinity gradient reveals impacts on gene expression at environmental levels

Exposure of mangrove oysters to nanoplastics through a microfluidic salinity gradient reveals impacts on gene expression at environmental levels

Zélie Venel*, Adeline Arini, Hervé Tabuteau, Julien Gigault, Magalie Baudrimont.

Article non publié, en cours de préparation.

INTRODUCTION

Around 335 million tons of plastic are produced each year (Plastics Europe 2017) and nearly 10% are released in aquatic environments (Thompson 2006, Eriksen et al. 2014). Huge areas of convergence, known as "ocean gyres", have been discovered in the Pacific, Atlantic and Indian Oceans and concentrate tons of plastic wastes. Some authors have suggested that physical (waves, temperature and UVs) and chemical (oxidation or hydrolysis) constraints would contribute to weaken plastic structure and reduce them to smaller pieces (Albert A. Koelmans et al., 2015), until nanoscale particles (NP, Gigault et al., 2016). Based on this preliminary finding, some authors have reported the presence of nanoscale plastics in seawater samples taken directly from the North Atlantic Gyre (Ter Halle et al., 2017). Those plastic particles resulting from the degradation of larger ones are called nanoplastics (NPt), they have a size comprised between 1 and 1000 nm, and a colloidal behavior in the environment (Gigault et al., 2018c). Because of their nanometric size, shape and specific surface area, NPt can cross all biological barriers (cells, tissues) (Manfra et al., 2017). The hydrophobicity of NPts added to their important surface/volume ratio facilitates the adsorption of hydrophobic organic and inorganic compounds present in the environment, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or metals (Rochman et al., 2013b, 2013a; Velzeboer et al., 2014b). In addition, it is estimated that plastic particles can contain up to 4% of their total weight in additives such as plasticizers (Andrady, 2011), which can subsequently be released into the environment (Sajiki and Yonekubo, 2003; Teuten et al., 2009) or into the organs of aquatic organisms inducing toxicity (Lithner et al., 2009).

To date, most studies on microplastics and NPt have focused on functionalized polystyrene latex nanosphere (PSL) exposures (PSL-COOH or PSL-NH₂), as they represent up to 46% of the published data according to Haegerbaeumer et al. (2019). To our knowledge only one study have so far used NPts, and showed that NPts made from polyethylene collected in the North Atlantic gyre could inhibit growth of the green algae *Scenedesmus subspicatus* and increase fecal and pseudo-fecal production of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Baudrimont et al., 2019). In addition particle concentrations are way too high to be environmentally realistic (mg L⁻¹ or g L⁻¹).

Guadeloupean mangrove swamps are of particular interest since NPs can be discarded punctually from terrestrial local discharges, or be brought by the North Atlantic oceanic gyre, and remain captured in the mangrove swamp due to mangrove tree roots (Ivar do Sul et al., 2014; Martin et al., 2019). Those ecosystems are characterized by a stratification of freshwater and marine water separated by a salinity gradient due to the low water flow (Mohammed et al., 2014). To date, most studies focused on toxicity of plastic nanoparticles in fresh or marine waters but rarely in transitional waters. They used the same protocol consisting of spiking NP dispersion in the salted medium without taking into account the aggregation behavior of NP. Here for the first time, we used microfluidics to disperse plastic nanoparticles in a salinity gradient like in mangrove swamps before exposure.

In the present study, we chose a tropical bivalve species: *Isognomon alatus* living in Guadeloupean mangroves. Bivalves which are in permanent contact with the water column and the suspended matters for respiratory and nutritional purposes are commonly used as bioindicators because of their high capacities to accumulate pollutants at sublethal levels (Arini et al., 2014; Baudrimont et al., 2005). *Isognomon* oysters are widely present in tropical seas around the world and more particularly in mangroves, which made them good models to study effects of sea pollutants. Few studies investigated biomolecular biomarkers to characterize the early responses implemented towards the potential toxicity of plastic micro and nanoparticles. However gene expression is a sensitive indicator of toxicant exposure, oxidative stress, DNA damages and cellular metabolism. It represents an interesting way to characterize the toxicity of environmental pollutants, as well as the contamination levels likely to produce changes in gene expression levels (Gonzalez et al., 2006). We chose to use those molecular markers to characterize early responses of the potential toxicity of NPs in *Isognomon alatus*.

We aimed to use this species as a model to explore the toxicity of NPs through a salinity gradient, at environmental concentrations. For this aim we used 1) NPt issued from the fragmentation of larger plastic particles collected on the Guadeloupean marine coast, 2) NP issued from the fragmentation of manufactured polystyrene pellets, and compare their impact to 3) carboxylated standard nanospheres. These approaches should bring a first global analysis of the effects of NPs, dispersed in a salinity gradient, in a coastal organism barely used so far in ecotoxicology, for the study of tropical areas such as mangroves, impacted by both anthropic and coastal inputs of plastics.

MATERIALS AND METHODS

Oysters collection and acclimation

Flat tree oyster *Isognomon alatus* (Gmelin, 1791) were collected in Guadeloupe by the University of the Antilles in the Grand Cul-de-Sac Marin (16°18'58.1460"N 61°32'1.9379"O), away from discharges and effluent waste waters, and considered as a clean area. Oysters were maintained three weeks in 50 L glass tanks (100 oyster per tank) filled with artificial sea water (ASW, Instant Ocean Salt, 30 g/L), at 26°C, oxygenated with aeration pumps, until used for experiments. Day/night alternating lighting was provided by neons (photoperiod 12:12). Tiles were disposed at the bottom of each tank to allow them to hang on, after cleaning of their shells. One third of each tank volume was changed each day for the first week, until oysters had fully decanted. Then one third of water was renewed two times a week until the end of the

acclimation period. Water was prepared the day before, to allow its temperature, oxygen and salinity to be adjusted before being introduced in oyster tanks. Oysters were fed with two green and brown algal suspensions: *Isochrysis sp* and *Thalassiosira sp* (around 15 000 000 cell/ml, 20 mL per tank every two days). In case of oyster mortality, the organisms were immediately removed from tanks.

Nanoplastics

Reference nanoplastics have been prepared according to El Hadri and al. (2020) protocol. Virgin polystyrene pellets were used to obtain polystyrene nanoparticles (PS-NP) and plastic pieces collected on Guadeloupe beaches were used to obtain a mix composed of 90% polyethylene and polypropylene nanoparticles (NPG), both with irregular shape (see Figure 68 in SI). There was no surfactant in this nanoplastics, only 6% of residual ethanol. 200 nm polystyrene standard nanosphere with carboxylate functions (PSL-COOH) and unknown surfactant composition, were purchased from Polyscience. All nanoparticles were dispersed in MQ water (18 MΩ cm⁻¹, Millipore water purification system, Merck, Darmstadt, Germany). Table 4 summarize nanoparticles characteristics. PS-NP dispersion was constituted of two populations of 52±20 nm and 115±20 nm with some particles around 620±70 nm (Figure 67B in SI). NPG dispersion was composed of two populations of 250±50 and 390±20 nm (Figure 67A in SI). We chose nanoparticle concentration in the ppb (µg L⁻¹) range to be environmentally relevant.

Since the average diameter of nanoparticles are close to each other we consider that mass concentration and particulate concentrations are equivalent and comparable between each nanoparticles type (for a 1 µg L⁻¹ mass concentration, particular concentration vary from 5.6 10⁴ to 1.78 10⁵ particule mL⁻¹).

Table 4 : plastic nanoparticles characteristics and exposition concentrations

	Stock dispersion concentration (mg L ⁻¹)	Z-average (nm)/PDI (pH7)	Zeta potential (mV)	Oyster exposure concentration (µg L ⁻¹)				
				Control	C1	C2	C3	C4
PS-NP	50	319/0.20	-44 ± 2	0	4	37	222	333
NPG	20	220/0.21	-30 ± 2	0	1	15	44	133
PSL-COOH	200	217/0.048	-38.6 ± 2	0	0.34	1		

Experimental design

Each condition consisted in a 1L glass tank, filled with artificial sea water (ASW, Instant Ocean Salt, 30g L⁻¹) maintained at 26°C and oxygenated with an aeration pump. The day before the start of the experiment, four oysters were introduced in each tank. They were fed with 10 mL of *Isochrysis sp* algae (15 000 000 cell mL⁻¹) 2h before the exposure started, to avoid a contamination by the trophic route. Temperature, pH, salinity, and water levels were checked daily to be adjusted, if necessary.

Reference nanoplastics were previously dispersed in a salinity gradient using a microfluidic device as described in Venel et al. article 1 (n.d. in preparation). The two outlets of MD were

put in the exposition tank as illustrated on Figure 66. To respect an exposure duration longer than 1 hour, for C1 and C2 concentrations, nanoplastics stock dispersion was diluted 3 time and 30 times respectively, before entering in the microfluidic device. Stock dispersion was used at initial concentration for C3 and C4. At Day 0, the experimental units were gradually exposed through a microfluidic device to 2 to 6 ml of NPG, PS-NP or PSL-COOH depending on the initial concentration, to reach concentrations summarized in Table 4.

Stability of NP dispersed through MD, in ASW was investigated prior to oyster exposure (aggregation kinetics in Figure 69 and Figure 70 in SI). PS-NP Z-average increases rapidly during the first time to reach a mean Z-average of $1300 \text{ nm} \pm 500 \text{ nm}$ after 180 min. Then aggregation curve reach a plateau where the mean Z-average is roughly stable, around $1500 \pm 500 \text{ nm}$ at 400 minutes and $2100 \pm 400 \text{ nm}$ at 1400 minutes (i.e. after 1 day). NPG initial Z-average increased from 220 to $2200 \pm 800 \text{ nm}$ after 1 day. PSL-COOH were completely stable in ASW and no increase of initial hydrodynamic diameter (217 nm) were noticed.

Oysters were dissected after 7 days of exposure to NPs. Gills and visceral mass were collected from two individuals of the same experimental unit and pooled to get enough tissue mass for analyses. Samples were stored at -80°C in 500 μL of RNA later before analysis of gene expression.

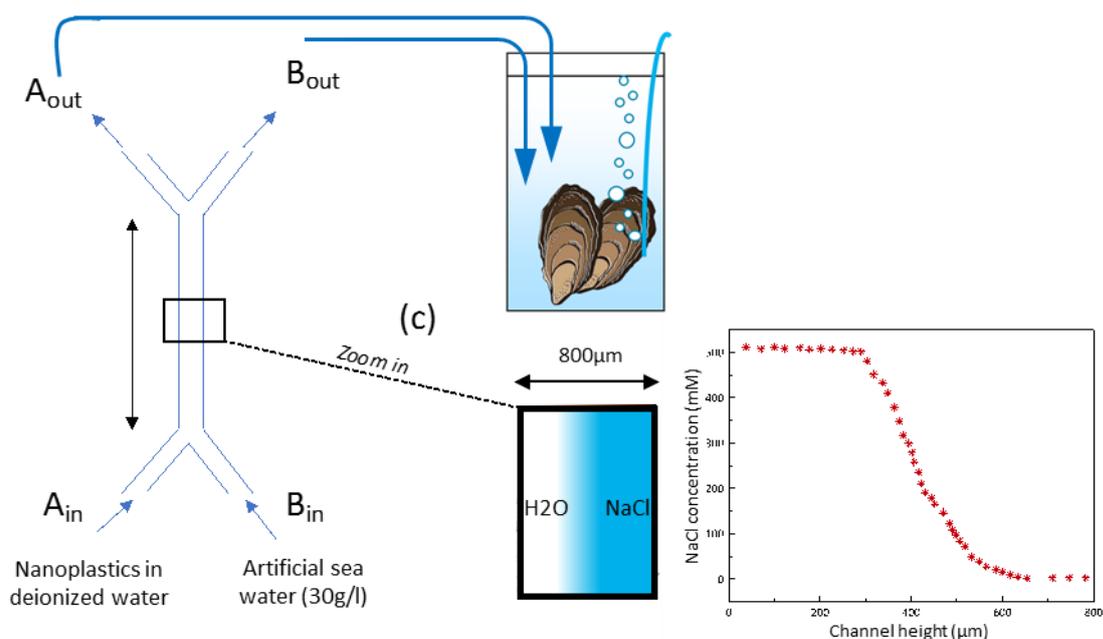


Figure 66 : Experimental design : dispersion of nanoplastics through a salinity gradient in the microfluidic device. The two outlets of the microfluidic device plunged in the exposure unit.

Looking for genes

The total RNAs of *Isognomon alatus* were sequenced by Lemer et al. (2019) and found on NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS1382830>). The data were assembled with the Trinity tool provided by the Galaxy server (<https://usegalaxy.org/>). Once the transcriptome obtained, it was downloaded on the Blast server and used to be aligned with sequences of genes

of interest from other mollusk species. When good alignments were possible, primers were designed and used for PCR amplification of *Isognomon alatus* genes. Electrophoresis gels were run to confirm the amplification of one DNA fragment (having the same size as the expected gene). Amplifcons were sequenced and the sequences were used to design primers specific to *Isognomon alatus* (with Primers 3). The primer efficiency was determined for each pair by performing serial dilutions to get standard curves.

Table 5 : Genes names and functions

Gene	Name	Function
<i>B actin</i>	Beta Actine	Housekeeping gene
<i>RPL7</i>	Ribosomal protein L7	Housekeeping gene
<i>cltc</i>	Clathrin heavy chain	Endocytosis
<i>cav</i>	Caveolin	Endocytosis
<i>abcb1</i>	ATP Binding Cassette Subfamily	Detoxification
<i>cox1</i>	Cytochrome C oxidase	Mitochondrial metabolism
<i>12s</i>	Mitochondrial 12s rRNA	Mitochondrial metabolism
<i>cat</i>	Catalase	Oxydative stress
<i>sod1</i>	Superoxide dismutase 1	Oxydative stress
<i>gadd45</i>	Growth Arrest and DNA Damage	DNA repair
<i>p53</i>	Tumor protein p53	DNA repair, apoptosis
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Apoptosis, DNA repair and oxidative stress
<i>bax</i>	BCL2	Apoptosis

Transcriptomic analyses

Differential gene expression was assessed in gills and visceral mass (VM) of oysters. The total mRNA extraction was performed with the SV Total RNA Isolation System (Promega), according to the manufacturer's instructions. The concentration of extracted RNA was measured with a microplate spectrometer (BioTek EPOCH) and a Take3 plate to estimate the purity of nucleic acids by comparing the ratio between values measured at 260 and 280 nm (purity is ensured if result is over 2). All RNA samples had a ratio over 2. The RNA samples were diluted to have the same concentration in all samples before carrying out the reverse transcription (RT). A concentration of 30 ng/μL of RNA was used for the RT, using the GoScript Reverse Transcription System (Promega), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were incubated in an Eppendorf Mastercycler to synthesize cDNA after the reagents addition. cDNA samples were kept at -20°C until their use for real-time PCR amplification.

Thirteen genes involved in endocytosis, oxidative stress, detoxification, respiratory chain, DNA repair and apoptosis and two reference genes were assessed (Table 1). Real-time PCR reactions

were performed in a LightCycler 480 (Roche) to quantify cDNA amplification. The kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) was used for PCR reactions, in 96-well plates containing the 5x buffer, the *Taq* polymerase, MgCl₂, dNTP and SybrGreen. In each wells, were added 2 μL of a gene specific primer pair, at a final concentration of 5 μM for each primer (**Table 5**), 12.5 μL of qPCR Master Mix mixed with 6.5 μL of RNA free water, 5 μL of cDNA, and mixed to before achieving PCR amplifications.

The qPCR program began by one cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The amplification specificity of each gene was checked with the PCR product dissociation curve, obtained by the gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. The relative quantification of each gene expression level was normalized according to the gene expression of two reference genes: *β-actin* and *rpl7* (according to the GeNorm method). The 2^{-ΔCt} method described by Livak and Schmittgen (2001) was used to calculate the differential gene expression, using ΔCt which represents the difference between the cycle threshold (Ct) of a specific gene and the Ct of the geometric mean of the Ct of the two reference genes. Induction factors of gene expression were calculated in comparison with the controls (not exposed to nanoplastics) according to the following equation:

$$IF = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ exposed}}}{2^{-\Delta Ct \text{ control}}}$$

Statistics

Significant differences between treatments were revealed using statistical tests. Normality and homoscedasticity of distribution was checked using Shapiro Wilk and Levene test. Data were converted to a normal distribution when necessary using box-cox transformation. If normality and homoscedasticity criteria were respected, ANOVA test or T-test between control and contaminated conditions were applied, followed by Tuckey HSD post hoc. Otherwise the non-parametric Kruskal-Wallis test was performed with post hoc U Mann-Whitney (Statistica 8). A probability of p < 0.05 was considered significant for all statistical tests.

RESULTS AND DISCUSSION

No mortality of oysters was observed throughout the 7 days of exposure.

Gene expression levels

Two housekeeping genes were used as control (*β actin* and *rpl7*) and their expression showed no significant difference among the different treatments (data not shown). The geometric mean of these two reference genes was used to normalize target gene expression. Overall the three types of NPs used in the study triggered significant changes in gene expression, in gills and visceral mass of oysters. After NPG exposure, an average of 50% and 61% of gene expression were significantly different from control oyster, in gills and visceral mass, respectively. Similarly, 59% and 52% of gene were significantly modulated in gills and visceral mass respectively for PS-NP, and 45% and 55%, respectively for PSL-COOH. (Table 6).

Table 6 : Differential gene expression observed in gills and visceral mass of oysters after direct contamination with nanoplastics. Only statistically significant results are reported. Results are given as induction (>1) or repression (<1) factors as compared to control oysters. - : identical to control levels. NA : not available.

NP concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NPG				PS-NP				PSL		
	C1 1	C2 15	C3 44	C4 133	C1 4	C2 37	C3 111	C4 333	C1 0,34	C2 1	
Organ and function	Gene										
<i>Gills</i>											
Endocytosis	<i>cav</i>	6.57	1.9	-	0.21	1.75	2.4	2.5	-	-	3.6
	<i>cltc</i>	-	4.09	7.12	7.53	109	104	50	3.7	-	NA
Oxidative stress	<i>cat</i>	0.30	-	3.94	2.98	11.8	-	-	19.0	4.36	NA
	<i>sod1</i>	2.19	1.85	-	-	0.12	-	-	0.43	-	NA
Mitochondrial metabolism	<i>12s</i>	7.30	2.11	4.37	6.24	19.8	11.7	12.7	2.8	-	2.0
	<i>cox</i>	-	-	3.44	-	7.6	6.7	5.9	4.3	2.49	3.3
DNA repair or apoptosis	<i>p53</i>	4.41	-	-	-	2.9	-	-	-	-	NA
DNA repair	<i>gadd45</i>	-	0.55	-	-	3.2	4.9	4.8	-	-	6.3
Apoptosis	<i>bax</i>	-	2.38	-	3.70	-	-	-	2.5	-	NA
	<i>gapdh</i>	0.17	-	-	-	-	-	-	-	2.17	NA
Detoxification	<i>mdr</i>	11.48	-	-	-	2.9	3.1	3.6	-	-	5.6
<i>Visceral mass</i>											
Endocytosis	<i>cav</i>	85.1	15.06	5.39	32.4	81.1	NA	7.3	-	-	-
	<i>cltc</i>	0.35	-	-	-	0.15	NA	-	-	3.83	2.62
Oxidative stress	<i>cat</i>	0.09	0.19	0.03	0.39	0.07	NA	-	-	-	0.05
	<i>sod1</i>	3.66	2.99	2.92	4.04	11.3	NA	1.6	-	0.29	0.13
Mitochondrial metabolism	<i>12s</i>	-	-	-	3.13	-	NA	2.6	2.1	6.37	7.74
	<i>cox</i>	0.20	-	-	0.39	-	NA	-	1.7	8.35	6.75
DNA repair or apoptosis	<i>p53</i>	3.63	-	-	-	9.5	NA	-	-	-	-
DNA repair	<i>gadd45</i>	-	-	1.6	-	0.42	NA	1.96	-	2.19	-
Apoptosis	<i>bax</i>	-	2.85	2.90	3.19	2.7	NA	-	-	-	0.51
	<i>gapdh</i>	0.08	0.31	-	0.23	0.21	NA	-	-	-	-
Detoxification	<i>mdr</i>	40.7	6.44	3.44	4.96	34.3	NA	4.7	1.7	0.42	-

Exposure to NPG

NPG showed a dose response effect more important at the lower concentration ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) with 64% and 73% of significantly modulated genes in gills and visceral mass, respectively. These genes were involved in endocytosis, oxidative stress, DNA integrity and detoxification functions. Indeed, in the gills, at $1 \mu\text{g L}^{-1}$, there was a 6.6 fold-change of *cav* gene, a 2.2 fold-change of the *sod1* gene coupled to a repression of *cat* gene (0.3), a 7.3 fold-change of the *12S* gene, a 4.41 fold-change of the *p53* gene, coupled to a repression of *gapdh* (0.3) and a high induction of *mdr* (11.5). This could suggest that there was a caveolin endocytosis of NPG nanoparticles that triggered a response against oxidative radicals O_2^- , (showed by the up-regulation of *cat*), and a higher production of mitochondria (highlighted by the up-regulation of *12s*), because cells may have needed more energy to fight against nanoplastic contamination (Gonzalez et al., 2006). The induction of *p53* suggests that DNA was also impacted, meaning a possible cell cycle arrest in order to repair DNA. Finally it seems that mechanisms of cell excretion were implemented to eject nanoplastics or other substance with the up-regulation of the gene of the *mdr* pump.

In the gills, when particle concentration increase, caveolin dependent endocytosis tends to decrease in favor to clathrine dependent endocytosis. Indeed, for the concentration of $133 \mu\text{g L}^{-1}$ we observed a fold-change of 7.5 for *cltc* gene, coupled to a 5-fold repression of *cav* (0.21). Concerning oxidative stress, induction of *sod1* decreases to the favor of *cat* gene induction to with a fold-change of 3.9 and 3.0 for 44 and $133 \mu\text{g L}^{-1}$ concentrations respectively. It suggest a higher production of H_2O_2 . The value of *12S* expression was repressed at $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (2.11 fold-change) and induced at 44 and $133 \mu\text{g L}^{-1}$ (4.4 and 6.2 fold-change), meaning a higher quantity of mitochondria. At the $44 \mu\text{g L}^{-1}$ concentration, there is also an induction of the *cox* gene (3.4). DNA repair functions are repressed when NP concentrations increase (fold-change 0.45 fold-change for *gadd45* at $15 \mu\text{g L}^{-1}$) suggesting an increase of DNA damages. This is supported by the apoptosis response, which was initiated through *bax* induction (2.4 and 3.7 fold-change change at 15 and $133 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). Detoxification processes are not active for the concentrations ranging between 15 and $133 \mu\text{g L}^{-1}$.

In the visceral mass, endocytosis is very active, and concerns only the caveolin-dependent pathway for all tested concentrations (fold-change >5.4), but the highest fold-change is observed at the lower concentration with a fold-change of 85. Oxidative stress is reflected by the induction of *sod1* for all the concentrations (fold-change > 2.9) coupled to a repression of *cat* (fold-change < 0.4). The increase of mitochondria number was implemented only at $133 \mu\text{g L}^{-1}$ concentration (3.1 fold-change). DNA damages showed a similar pattern to gills, at all the concentrations tested (*p53* and *bax*), but *gapdh* was also repressed at 15 and $133 \mu\text{g L}^{-1}$. The *mdr* gene is induced at all the concentrations tested with a maximum induction at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (fold-change of 40).

Overall, it seems that NPG nanoparticles could enter in the cell through caveolin or clathrine dependant endocytosis in gills, meaning that, unlike the observations made with DLS measurements, there is still nanoparticles with a diameter ranging between 60 and 200 nm in the media, corresponding to the maximum nanoparticle size that endocytosis could carry (Kou et al., 2013; Rejman et al., 2004). The *mdr* detoxification pump production could stand for the

presence of toxic substances adsorbed on NPG surface that need to be expelled from the cells. Either nanoparticles or toxic adsorbed substances have led to an oxidative stress and DNA damages, especially at the lowest concentration.

Visceral mass results indicate that NPG or substances adsorbed onto their surface, have been able to translocate from gills to visceral mass, certainly by internal circulation or ingestion. Through one or the other mechanism, NPG can penetrate into visceral mass cells to induce oxidative stress and DNA damages. Cells trigger defensive mechanisms by activating DNA repair and expulsion of xenobiotics through MDR transporter. Detoxification is very active in the visceral mass as this organ is known for its storage, metabolic and detoxification functions (Marigomez et al., 2002).

NPG induced more toxic effect (oxidative stress) in visceral mass at low concentration, and effects were similar between the two organs at high concentration.

Exposure to PS-NP

PS-NP showed a dose response effect more important at the lower concentration similarly to NPG. Indeed, there is 73% and 82% of genes significantly modulated in gills and visceral mass, respectively. In gills, clathrin-dependent endocytosis is more involved than the caveolin one at all concentrations tested. The induction of the *cltc* gene was maximum at 4 and 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ fold-change (>104 fold-change) and lower when particle concentrations increase (50 and 3.74 fold-change for 111 and 333 $\mu\text{g L}^{-1}$ conditions respectively). This is higher from what was observed with NPG (fold-change <7.5 for *cltc*), and endocytosis is alternatively caveolin or clathrin dependent for NPG depending on the particle concentration. Oxidative stress is highlighted by an induction of the catalase gene at 4 and 333 $\mu\text{g L}^{-1}$ (fold-change > 11.7, higher than for NPG exposure) coupled to a repression of the *sod1* gene. Concerning mitochondrial metabolism, there is a similar response to NPG with a dose response effect, but the fold-change is globally higher for comparable concentrations (>11 fold-change). However, for PS-NP, *12S* and *cox* are induced together. PS-NP induced DNA damages, reflected by the induction of *p53* and *gadd45* genes at the lowest concentration (fold-change around 3), meaning a necessity to repair DNA. There is an induction of apoptosis at higher concentration than for NPG, namely 333 $\mu\text{g L}^{-1}$, suggesting that NPG induced more toxicity than PS-NP. Detoxification process is induced through the *mdr* gene at 4; 37 and 111 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2.8-3.6 fold-change). For the 333 $\mu\text{g L}^{-1}$ condition, the *mdr* gene is no more induced. Some authors assumed that the expulsion of xenobiotics is too energy consuming (ATP) when xenobiotic concentration is too high (Achar et al., 2004). As a result, MDR transporters are not used and xenobiotics accumulate in the cell. This explains why toxic effects are more important in cells at this concentration (oxidative stress and apoptosis).

Overall, it seems that PS-NP nanoparticles could enter in the cell through caveolin and clathrin dependent endocytosis, like NPG nanoparticles, meaning that unlike to DLS measurement, there is still nanoparticles with a diameter ranging between 60 and 200 nm in the media, according to the maximum nanoparticle size that endocytosis could carry (Kou et al., 2013; Rejman et al., 2004). Either nanoparticles or additives have led to oxidative stress, increase of energy consumption and DNA damages, especially at the lowest concentration.

PS-NP showed similar response in visceral mass than NPG, with higher response to the lower concentration (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) for endocytosis and detoxification. However, there is a higher induction

of *sod1* at $4 \mu\text{g L}^{-1}$ compared to the other concentration (fold-change of 11.3). At $333 \mu\text{g L}^{-1}$, an induction of *12S* and *cox1* gene denoted an increase of the mitochondrial metabolism probably due to a higher energy demand. Apoptosis is implemented at concentrations as low as $4 \mu\text{g L}^{-1}$, indicating that PS-NP are more toxic than NPG in visceral mass. But at $111 \mu\text{g L}^{-1}$, there is no more apoptosis, and DNA repair is activated via *gadd45* gene induction.

As for NPG, PS-NP can translocate from gills to visceral mass, and penetrate into cells causing oxidative stress, DNA damages, and detoxification processes. PS-NP caused more damage in visceral mass at low concentrations, whereas damages were more pronounced in gills at high concentrations. Since PS-NP were made from virgin polystyrene pellets, there is no pollutant adsorbed onto their surface, or toxic pigments that can be released.

Exposure to PSL-COOH

Like reference nanoplastics at a concentration of $1 \mu\text{g L}^{-1}$, PSL-COOH activated caveolin dependent endocytosis in gills (fold-change of 3.6). No results could be obtained concerning oxidative stress at $1 \mu\text{g L}^{-1}$, but there was an induction of the *cat* gene at $0.34 \mu\text{g L}^{-1}$ (fold-change of 4.4). There is a respiratory stress illustrated by induction of *12S* and *cox1* genes with a factor of 2 and 3.3 respectively, at $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Even if we have a lack of data concerning DNA damages at $1 \mu\text{g L}^{-1}$, the *gadd45* induction (6.3 fold-change) shows a need to repair DNA. At $0.34 \mu\text{g L}^{-1}$ an induction of the *gapdh* gene (factor of 2.17) could indicate a need for DNA repair, and/or the induction of apoptosis and/or oxidative stress. A detoxification process was set up with the induction of the *mdr* gene (5.6 fold-change at $1 \mu\text{g L}^{-1}$).

PSL-COOH induced different effects in the visceral mass compared to gills. Endocytosis was rather clathrin-dependent in visceral mass (fold-change of 2.6) which is different from what was observed after NPG and PS-NP exposures. PSL-COOH caused a higher respiratory stress in the visceral mass than in gills (fold-changes of *12S* and *cox1* >6.7) which is also higher than for the other particles tested. Our data failed to show effects on the oxidative stress, DNA damages or detoxification because no induction of these genes could be observed.

As for nanoplastics models, it seems that PSL-COOH can translocate from gills to visceral mass, causing respiratory stress, but no DNA damage. Overall, PSL-COOH are more toxic in gills than in visceral mass. Results indicate that PSL-COOH can enter in the gills cells through endocytosis. According to Kou et al. (2013) those particles are too large, but according to Rejman et al (2004) clathrin could carry particles up to 200 nm.

Comparative toxicity between the three nanoplastics models

Concerning endocytosis, protein involved are not the same depending on the nanoparticle type or tissue. In visceral mass caveolin dependent endocytosis seems to be the privileged process for NPG and PS-NP internalization, whereas the clathrin pathway is the main entry route for PSL-COOH. In gills however, the privileged endocytosis process is concentration-dependent. At low concentrations (1 or $4 \mu\text{g L}^{-1}$), *cav* is more induced by NPG and PSL-COOH, and when concentrations increase, *cltc* becomes the more induced. PS-NP followed the inverse process.

A previous study showed that negatively charged PSL-COOH are more easily internalized by macrophage cells via phagocytosis. PSL-COOH particles accumulated in the liver, where

macrophages of the reticuloendothelial system reside (Lunov et al., 2011). Endocytosis has been also shown for irregular shape nanoplastics around 50-150 nm, that have been internalized in endo-lysosomes (Magrì et al., 2018). Some authors suggest that the mechanism of the internalization of negatively charged NPs occurs via clathrin pathways (Kögel et al., 2020). According to Rejman et al. (2004), clathrin dependent endocytosis can internalize nanoparticles up to 200 nm while caveolin dependent endocytosis takes over when particle size increases to become predominant for nanoparticles up to 500 nm. In gills, caveolin dependent endocytosis is maybe favored because of the higher size of individual nanoplastics models or because they have formed aggregates as discussed after. Since PSL-COOH have a size of 200 nm and are very stable in high salinity, they could be taken by clathrin dependent endocytosis. In visceral mass, endothelial cells have high phagocytosis and endocytosis activity because of the digestive functions (Galloway, 2015), so the high induction of caveolin is in accordance with this function.

High endocytosis activation in gills, coupled to toxic effect inside cells for all three types of particles is surprising, because mucus secretion should lead to a sequestration of nanoparticle outside tissues, thus protecting cells from particle penetration (Handy et al., 2008). Indeed, high ionic force tends to aggregate nanoparticles, as showed on Figure 69 and Figure 70 in SI and elsewhere (Chen and Elimelech, 2006; Venel et al., n.d. in preparation). It is worthwhile to note that high mucus secretion leading to deposit on tank walls, have been noticed for the higher concentrations of NPG and PS-NP used.

Due to the high salinity and the probable presence of organic matter coming from oysters, nanoplastics should form heteroaggregates that should sediment and decrease the bioavailability of nanoplastics. But results showed an uptake of nanoplastics models and a translocation to the digestive system even if NP aggregation occurred in the medium. Indeed, some studies showed that aggregated PSL are internalized by endocytosis in the yeast (Nomura et al., 2013) and heteroaggregates of PSL and marine snow enhance nanoparticle uptake in mussels and oysters (Ward and Kach, 2009)

There is very few data available on literature about the potential of NPs to generate an oxidative stress. The oxidative stress is characterized by an increase of reactive oxygen species (ROS) production (superoxide anion/hydroxyl radical, hydrogen peroxide) that disrupts redox functions in the cell. This high quantity of ROS lead to several damages such as lipid peroxidation or DNA breakage (Fu et al., 2014). Mitochondria are the main source of ROS production in cells. However, some studies already reported an oxidative stress in response to NP exposure. For example, oyster spermatozoa exposed to carboxylic nanoplastics of 100 nm at 1 mg L⁻¹ suffer from an oxidative stress in linked to an increase in ROS production after 1 hour exposure (Gonzalez-Fernandez et al., 2018). Chen et al. also showed an oxidative stress, after 5 days of exposure to 50 nm PSL at 1 mg L⁻¹ on zebrafish larvae (Chen et al., 2017). Jeong et al. (2016) showed that 50 and 500 nm PSL at 10 µg mL⁻¹ induced an increase of ROS level compared to the control, in rotifer after 24h of exposure. 50 nm PSL also increased SOD, GST (Glutathione S-transférase), GR (Glutathione reductase), and GPx (Glutathione peroxidase) antioxidant proteins activity, whereas, 500 nm PSL increase only GR and GST activities. Our results are in agreement with these previous studies, but oxidative stress is shown in our study at very low levels of exposure, from only 1 µg L⁻¹ of nanoplastics in the water, which suggests a high degree of impacts of these particles in natural environment.

To date, to our knowledge, no study reports effects of NPs on apoptotic pathways in bivalves. Jeong et al. (2016) showed that rotifer exposure to 50 nm PSL at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ during 24h, lead to phosphorylation of JNK and p38 MAPK, two proteins of the MAPK pathway leading to apoptosis. A study on sea urchin embryos exposed to 50 nm PS-NH₂ ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) showed an induction of the caspase gene (*cas8*) involved in the apoptotic pathway after 24h, but not for PS-COOH ($3 \mu\text{g L}^{-1}$). The authors suggested that the apoptotic response could result from a possible cell membrane damage (Della Torre et al., 2014). Canesi et al. (2015) also reported a decrease of mitochondrial membrane potential in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes exposed 45 min to 50 nm PS-NH₂ at $50 \mu\text{g/ml}^{-1}$, which was assumed to be a pre-apoptotic sign. However, another study on 24 and 48 dph *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to 50 nm PS-NH₂ (150 ng L^{-1}) did not show any modulation of the *p53* gene, nor antioxidant defense (*cat*, *sod*) (Balbi et al., 2017). However, all these studies are conducted again at relative high levels of exposure compared to our, which shows apoptotic responses from only 4 to $15 \mu\text{g L}^{-1}$.

All these results underlines the lack of data available to date in the literature on the effect of NPs on cell viability and apoptotic responses in bivalves, even more at relevant environmental concentrations. More data is available on microplastic toxicity towards aquatic organisms, especially bivalves. However, many studies have pointed out the main differences between microplastics and NPs. Not only their size can influence their toxicity. Indeed, their surface charge, shape (pellets vs fractioned plastics), oxidation status, and volume/surface ratio make them possibly more hazardous for wildlife than microplastics (Andrady, 2011; Bouwmeester et al., 2015; Manfra et al., 2017).

Concerning MDR transporter, no studies were found concerning negatively charged nanoparticles. However, Della Torre et al. (2014) showed that the exposure of sea urchins to 50 nm PSL-COOH ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) resulted in an upregulation of the *mdr* gene—efflux pump after an exposure of 48h. Similar results were observed with a significant up-regulation of the *abcb* gene in *Mytilus galloprovincialis* larvae (24 hpf) exposed to 50 nm PS-NH₂ ($150 \mu\text{g L}^{-1}$) (Balbi et al., 2017). However to our knowledge, ABR transporter family are not able to expulse nanoparticles. So there is two possibilities (i) nanoplastics in general, induce defense mechanisms in the cells, independently of the fact that NP could be expulsed or not, (ii) toxic substances are released from nanoplastics activating the *mdr* gene to expulse those substances. It could be intrinsic additives like plasticizer (Lithner et al., 2011, 2009; Teuten et al., 2009; Yin et al., 2018) for PS-NP. Concerning PSL-COOH, additive like surfactants or biocides should have penetrated the cell and activeted MDR detoxification pump. Indeed, as shown by several studies, additives present in commercial latex, like surfactants (Hrenovic and Ivankovic, 2007; Jahan et al., 2008; Rosety et al., 2001) and biocides (Pikuda et al., 2019) could be toxic for cells or could disturb cell functions like ABC transporter (Yin et al., 2018). So the toxic effect observed could be caused by additives.

As NPG are originated from naturally aged plastics in the environment, they could carry pollutants onto their surface like organic persistent pollutants or trace metals that could be released inside the cell (Cole et al., 2011; Koelmans et al., 2016).

Overall for the three types of particles, there is more toxic effect at low particle concentrations ($1\text{-}4 \mu\text{g L}^{-1}$). Table 7 summarizes particle toxicological effects according to gene functions and organs.

Table 7: Comparison of toxic impact for the NPG, PS-NP and PSL-COOH for low (1-40 $\mu\text{g L}^{-1}$) and high concentrations (40-130 $\mu\text{g L}^{-1}$). + 2<fold-change <3, ++ 4<fold-change <10, +++ 10 <fold-change <20, ++++ Fold-change >20. ! higher impact of the nanoparticles in the concerned organ.

Concentration	NPG		PS-NP		PS-COOH
	low	high	low	high	low
Gills		!	!		
Endocytosis	++	++	++++	++++	+
Oxidative stress	+	++	+++	(+++ 333 $\mu\text{g L}^{-1}$)	(++ 0.34 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Mitochondrial metabolism disruption	++	++	++++	+++	+
DNA repair	++		++	++	++
Apoptosis	+	+		(+ 333 $\mu\text{g L}^{-1}$)	(+ 0.34 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Detoxification	+++		+	+	++
Visceral mass		!	!		
Endocytosis	++++	++++	++++	+++	+
Oxidative stress	++	++	+++		
Mitochondrial metabolism disruption		+		+	++
DNA repair	+		++		
Apoptosis	+	+	+		
Detoxification	++++	++	++++	++	

In gills, the toxicological effects are nearly the same at low concentration for the three particles i.e. induction of endocytosis, disruption of mitochondrial metabolism, DNA repair and high detoxification. But in general, gene inductions are higher for PS-NP than for the others.

At high concentrations (111-133 $\mu\text{g L}^{-1}$) for PS-NP and NPG, endocytosis is more pronounced than at low concentration. NPG induced higher oxidative stress than PS-NP, except for the concentration of 333 $\mu\text{g L}^{-1}$ where PS-NP are more toxic. There is also a high disruption of mitochondrial metabolism for all three particles. DNA damage induced by PS-NP are less severe because DNA repair is still operational, whereas NPG induced apoptosis. This could be explained by the absence of *mdr* induction leading to an accumulation of NPG inside the cell. The low toxic effects of PS-NP are surprising when taking into consideration the strong induction of endocytosis genes, implying a higher entry of those NPs in the cell that should lead to more toxic effects.

In visceral mass, effects induced by NPG and PS-NP are roughly the same at low concentration, i.e. high endocytosis, oxidative stress, DNA damages and strong detoxification. PS-NP seems to be more toxic because they are causing apoptosis. PSL-COOH act differently, because there is less endocytosis, no oxidative stress, no apoptosis but they disrupt mitochondrial metabolism.

At high dose, for PS-NP and NPG there is endocytosis through caveolin, disruption of mitochondrial metabolism, DNA repair and detoxification. Gene inductions are more

pronounced for NPG than for PS-NP and there is also an apoptosis induction meaning that cells in visceral mass need to implement more defensive mechanisms after NPG exposure than after PS-NP.

Overall, on the whole genes tested, PS-NP are the most toxic particles at low concentrations (1 to 40 $\mu\text{g L}^{-1}$), and NPG are the most toxic particles at high concentrations (40 to 130 $\mu\text{g L}^{-1}$) as showed in Table 7. PSL-COOH induced the lowest effects on genes compared to other nanoparticle types. The higher toxicity of NPG and PS-NP could be explained by the shape of nanoparticles. Indeed, they have irregular shapes, nearly fractal, while PSL-COOH are spherical (see Figure 68 in SI). Moreover, both NPG and PS-NP have been aged (UV and mechanical for NPG, and only mechanical action of PS-NP), and therefore contain oxidized functions on their surface (El Hadri et al., 2020). Surface oxidation have been quantified on nanoplastics peeled by sonication of plastic fragment from Guadeloupe (of which organic matter have been removed by H_2O_2 and UV) by titration and have the highest oxidized surface compared to the other nanoparticles (0.383 mmol of active site g^{-1}) (Blancho, n.d. in prep). This value is close to the surface oxidation of PSL-COOH (0.342 mmol of active site g^{-1}). PS-NP have a lower surface oxidation (0.076 mmol of active site g^{-1}) because oxidation come from radicals creating because of breakage of covalent bond during grinding.

NPG toxicity at high concentrations could also be linked to xenobiotics adsorbed on their surface. A lot of studies showed that nanoplastics could act as vectors for contaminants because of their high affinity with persistent organic pollutants like PCB (Polychlorobiphenyl), PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) or organochlorin pesticides (Fries and Zarfl, 2012; Lee et al., 2014; Liu et al., 2016; Ma et al., 2016; Rochman et al., 2013a; Velzeboer et al., 2014b) and trace metals (Baudrimont et al., 2019; Davranche et al., 2019; Holmes et al., 2012; Rochman et al., 2014a). Total and adsorbed trace metals concentrations have been measured (**Figure 71** in SI) and showed a high proportion of aluminum, iron and zinc adsorbed on plastic pieces from Guadeloupe beaches (between 200 and 6000 $\mu\text{g/kg}$) and a low concentration of arsenic, lead and cadmium (mean of 32 and 13.9 and 13.9 $\mu\text{g/kg}$ respectively). Total trace metals concentrations have higher values and showed a high proportion of aluminum, iron, lead, and zinc (60-200 mg/kg). Those traces metals are toxic as demonstrated elsewhere (Barjhoux et al., 2012; Baudrimont et al., 2019; Freitas et al., 2018; Gonzalez et al., 2006; Albert A. Koelmans et al., 2015; Lu et al., 2018; Moreira et al., 2018) and could lead to the toxic effects underlined in our experiment.

Here we employ a very innovative method to mimic a salinity gradient of mangrove swamp by using a microfluidic device. In fact, the dynamic salinity gradient in the microfluidic chip acts as a filter and allows an exit of a significant amount of stable nanoparticles in salt water as shown in a previous study (Venel et al., n.d.). Basically, there is a high aggregation and a deposition of nanoparticles inside the microfluidic chip, but a low proportion of particle ($\approx 10\%$) can cross the salinity gradient without aggregating and can reach the high salinity exit (B outlet). These NPs are stable because of the drastic dilution, since particles are too far from each others and then the probability of collision is very low. Because of this high deposition inside the microfluidic chip, it has been estimated that between 10 to 50% of NPs can go out of the microfluidic chip. Therefore, the physiologic responses and toxic effects observed here at 1-4 $\mu\text{g L}^{-1}$ actually happen at much lower concentrations and is even more realistic towards environmental conditions. The use of microfluidic systems allow to have a significant amount

of stable NPs among aggregates and made possible for the first time to assess realistic toxic effects of NP in environmentally representative conditions.

A comparative study have been done by Arini et al. (n.d.) with the same NPs but using a batch mode protocol *ie* : dropwise addition of NPs in a high salinity media. In this case NPs may have aggregated rapidly in the media. For comparable concentrations in gills, we observed higher responses for NPG and PS-NP concerning endocytosis, and detoxification using the salinity gradient protocol compared to the batch mode one. In the visceral mass, with the microfluidic protocol, for both NPG and PS-NP, there was a higher induction of endocytosis (through caveolin), less mitochondrial metabolism disruption and more detoxification compared to batch mode protocol. In visceral mass, as in gills, there is an induction of oxidative stress with the microfluidic protocol but repression for batch protocol. For NPG, there is less DNA repair but more apoptosis. Overall, toxic effects are more important with microfluidic protocol than for batch protocol, meaning that even if particle aggregation behavior seems to be the same, it is not the case, and toxicity mechanisms are probably different. This results, underline the need to develop protocols mimicking environmental processes that occur along a salinity gradient for toxicological assessment of nanoplastics.

CONCLUSION

Overall results indicate that NPG and PS-NP dispersed by a microfluidic device mimicking a salinity gradient as observed in Guadeloupean swamps, induced a higher response on gene expression of oysters *Isognomon alatus*, concerning endocytosis, mitochondrial metabolism disruption, DNA repair, and detoxification in gills and visceral mass, even at very low concentration (1-40 $\mu\text{g L}^{-1}$) compared to PSL-COOH. We used for the very first time microfluidic devices to disperse environmentally realistic nanoplastics in a salinity gradients mimicking Guadeloupean swamps, and NPs showed a higher toxicity than in classical ecotoxicological batch dispersion. This very innovative method illustrates how the mode of exposure of organisms has a major influence on ecotoxicological assessment and understanding mechanisms of toxicity.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

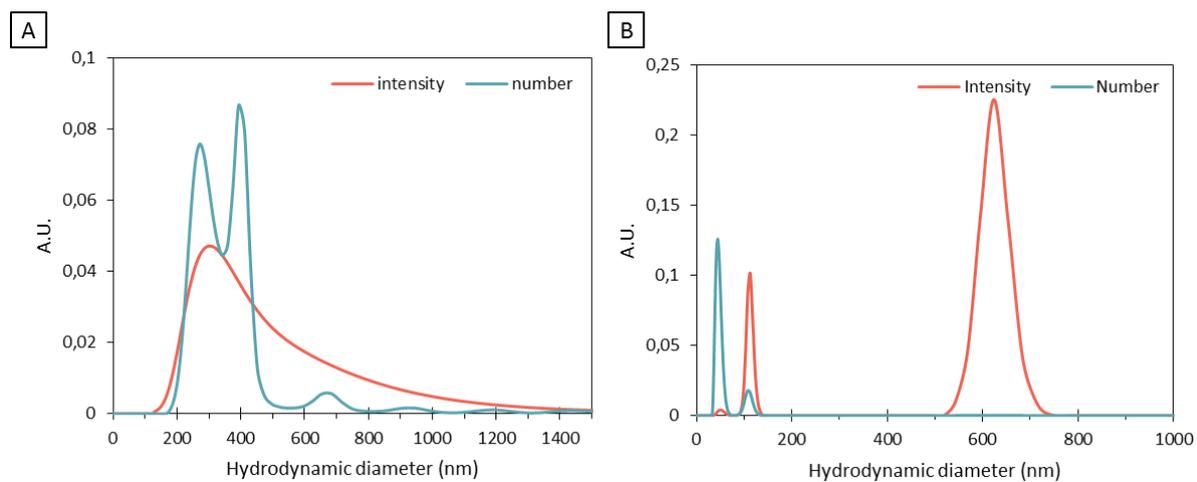


Figure 67: Intensity and number size distribution obtained by SBL algorithm. A: PS-ref. B: NPG

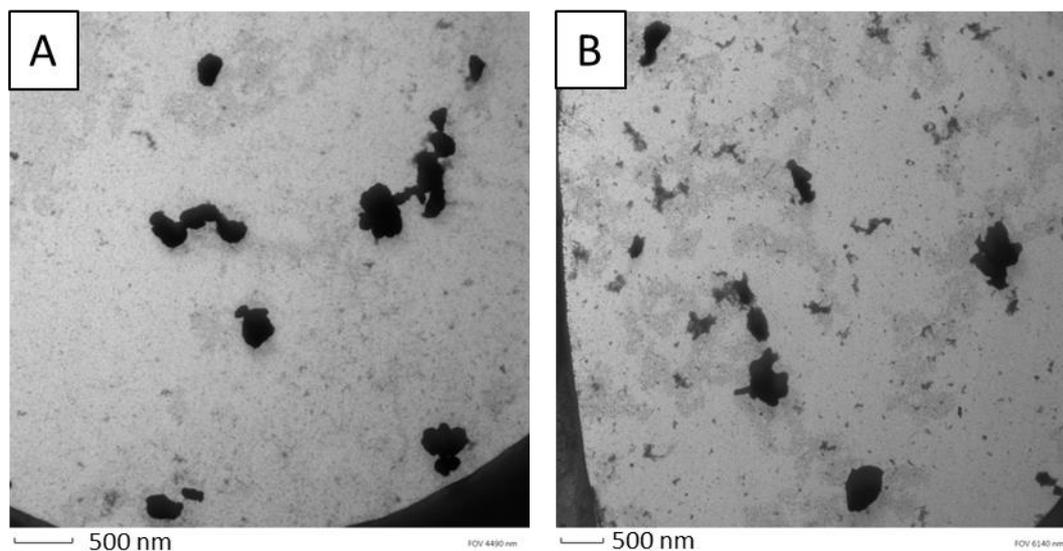


Figure 68 : TEM images of A: PS-NP and B: NPG.

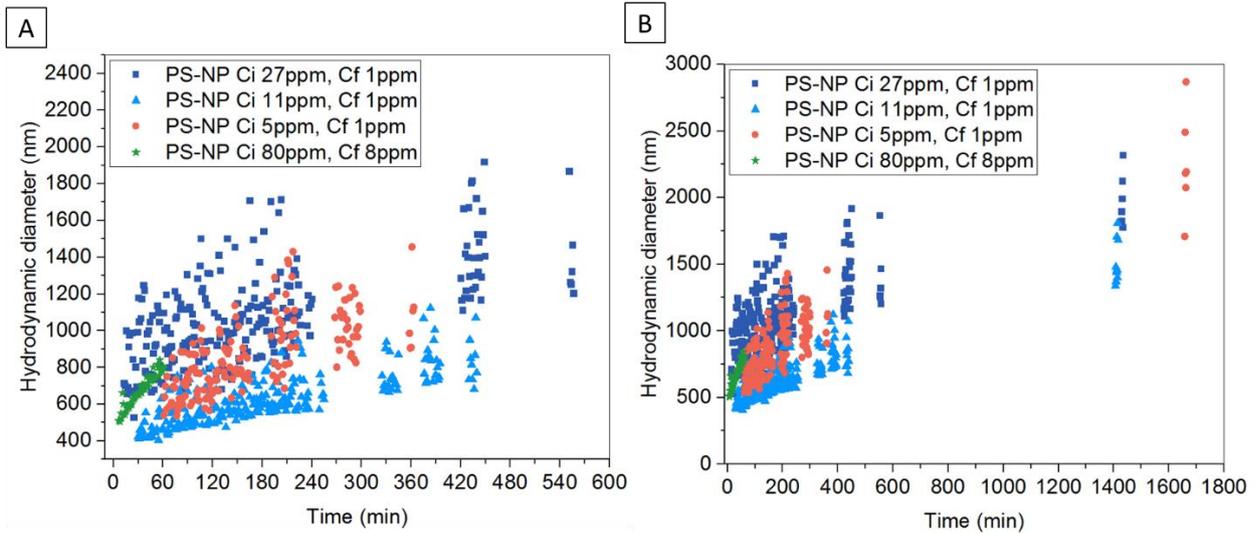


Figure 69: Aggregation kinetic of PS-NP dispersed through microfluidic device, with the two outlet plunged in a 10ml volume of artificial sea water. Z average obtained by Cumulant algorithm using *in situ* DLS measurement (Vasco flex, Cordouan Technologies).

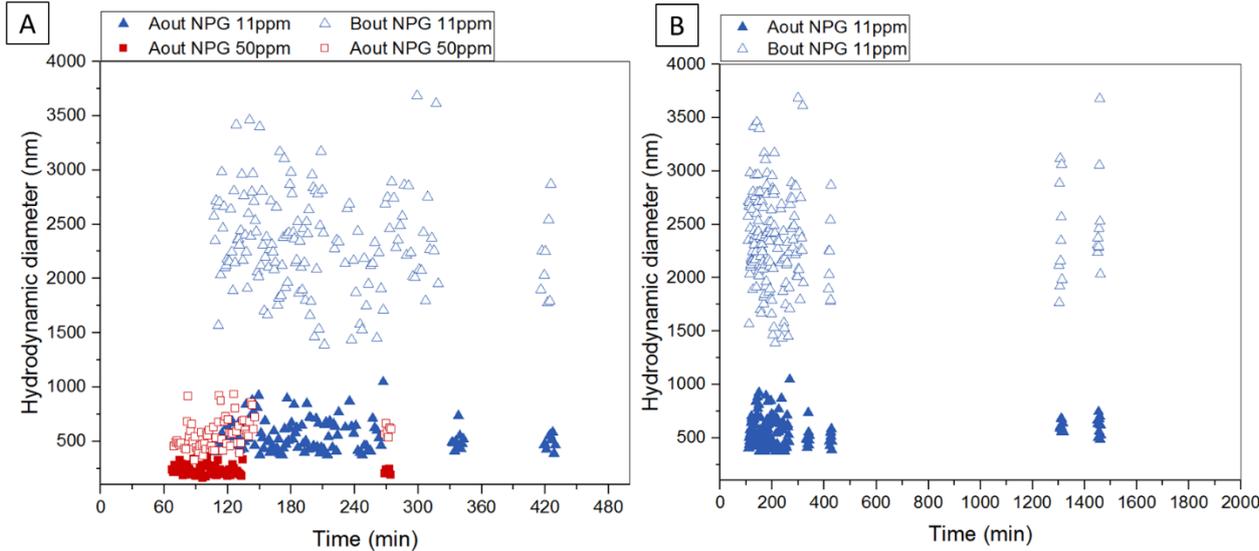


Figure 70 : Aggregation kinetic of NPG (50 and 11ppm) dispersed through microfluidic device in an artificial sea water gradient. Z average obtained by Cumulant algorithm using *in situ* DLS measurement (Vasco flex, Cordouan Technologies).

Table 8 : Nucleotide sequences of specific primer pairs of genes used in this study

<i>β-actine</i>	βactineIsognomonSq AACGAGCGATTCAGATGTCC	βactineIsognomonASq cgATTCCTGGGTACATGGTT
<i>rpl7</i>	RPL7IsognomonSq CCCAGGAAGGTCATGCAGTT	RPL7IsognomonASq TCCCAGAGCCTTCTCGATGA
<i>bax</i>	BaxIsognomonSq AACTGGGGCAGAGTTGGATG	BaxIsognomonASq AATTGCTTCCCAGCCTCCTC
<i>cat</i>	CATIsognomonSq CGAGGCTAGCCCAGACAAAA	CATIsognomonASq TTGGGGAAATAGTTGGGGGC
<i>cav</i>	CAVIsognomonSq CGTCGAGATCCAGACCTGTT	CAVIsognomonASq ACAGCATTGACTGCGTATGG
<i>cltc</i>	CLTCIsognomonSq AGACTCAGGACCCAGAGGAC	CLTCIsognomonASq ATCACACGGGTTCTATCGGC
<i>cox1</i>	CoxIsognomonSq GTTGCCTTGGTCGCTAGACT	CoxIsognomonASq GAGCGTCTTGGGCTTAGTCA
<i>gadd45</i>	GADD45alsognomonSq TTGGCTTGACAAAAGTGCCG	GADD45alsognomonASq CTGACAACCTGCATCTCGGT
<i>gapdh</i>	GAPDHIsognomonSq CACGGCAACACAGAAGGTTG	GAPDHIsognomonASq CCCTTCTGAAGTCGGCAAGT
<i>mdr</i>	MDRIsognomonSq GCATGTTGCAAGCCTGTCAA	MDRIsognomonASq CAGTCAACTCAAGCAACCGC
<i>p53</i>	p53IsognomonSq CGATGATCGGGTTCAGCAGA	p53IsognomonASq GAGCTCTCTCAACACAGCCA
<i>sod1</i>	SOD1IsognomonSq AGACTGCGTCACATGCTTCA	SOD1IsognomonASq GCGTCATGTAGGGGATCTGG
<i>12s</i>	12SIsognomonSq TCAGGTGTTACACAGCCGTC	12SIsognomonASq GCAGGCGTTTTAATCCCGTC

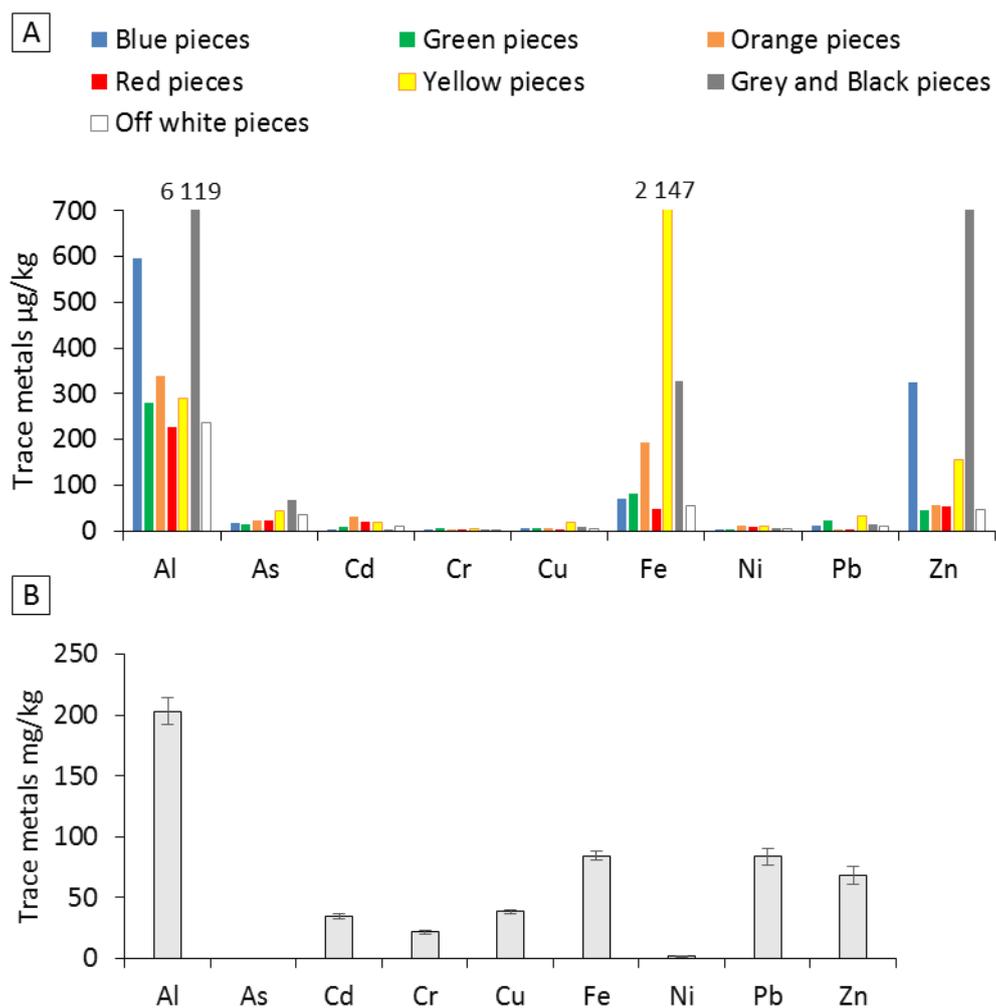


Figure 71 : Trace metals quantification in NPG. A : trace metals adsorbed on the surface of plastic pieces. B : total trace metals obtained after total acid digestion of NPG powder.

IV Conclusion

Nous avons pu tester un nouveau moyen de disperser les nanoparticules de plastiques dans des conditions plus proches de l'environnement afin d'exposer les organismes de façon réalistes. Nous avons également fait en sorte d'utiliser différents types de nanoparticules de plastiques représentatives de l'environnement de par leur distribution en taille, leur forme, leurs charges de surface ou la présence de polluants adsorbés à leurs surface.

Deux protocoles de dispersions ont été proposés, montrant tous les deux des effets toxiques différents des protocoles classiques de dispersion en batch. Ceci montre bien l'importance du mode de dispersion des particules lors des études écotoxicologiques.

Les trois types de particules (NPG, PS-ref, PS latex carboxylatés) ont également montré des effets toxiques différents, ce qui illustre l'importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules dans la biodisponibilité, la translocation, les effets physiologiques et la toxicité cellulaire.

Les effets toxiques sont apparus à des concentrations très faibles et représentatives de l'environnement de l'ordre du $\mu\text{g L}^{-1}$. Les nanoplastiques peuvent donc véritablement être considérés comme un danger pour les écosystèmes de transitions tels que les mangroves, les estuaires ou l'environnement marin.

Les protocoles d'exposition via la microfluidique mis au point durant cette thèse sont uniques et originaux et nous avons peu de recul quant à leur efficacité. Néanmoins, ces travaux sont très prometteurs et sont à continuer en améliorant par exemple, la largeur du gradient de salinité dans la micropuce, en complexifiant les gradients de salinité avec des gradients de matière organique ou en introduisant des courants de turbulence, afin de se rapprocher encore plus des conditions environnementales. Il serait intéressant de refaire des expositions avec en parallèle les protocoles A et B, avec des huîtres dans le même état physiologique, afin de pouvoir mieux comparer les effets écotoxicologiques induits par les nanoplastiques.

Ces travaux ont également permis d'identifier une partie du transcriptome d'*Isognomon alatus*, notamment des gènes d'intérêt dans les fonctions de défense cellulaire, ce qui permettra de faire d'autres études génétiques sur ce bivalve des mangroves tropicales, notamment directement *in situ*. Cela permettra d'obtenir plus d'informations sur le danger potentiel que subissent ces animaux face à la pollution anthropique.

V Bibliographie

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.014>
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Arini, A., Daffe, G., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., Baudrimont, M., 2014. What are the outcomes of an industrial remediation on a metal-impacted hydrosystem? A 2-year field biomonitoring of the filter-feeding bivalve *Corbicula fluminea*. *Chemosphere* 108, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.042>
- Arini, A., Gourves, P.Y., Gonzalez, P., Baudrimont, M., 2015. Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination: An experimental study on *Danio rerio*. *Chemosphere* 128, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.022>
- Arini, A., Venel, Z., Gigault, J., Bertucci, A., Etcheverria, B., Baudrimont, M., n.d. Nanoplastics from Caribbean marine coast generate more effects at the gene level than manufactured polystyrene nanoplastics on the swamp oyster *Isognomon alatus*.
- Balbi, T., Camisassi, G., Montagna, M., Fabbri, R., Franzellitti, S., Carbone, C., Dawson, K., Canesi, L., 2017. Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation. *Chemosphere* 186, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.120>
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.011>
- Baudrimont, M., Arini, A., Guégan, C., Venel, Z., Gigault, J., Pedrono, B., Prunier, J., Maurice, L., Ter Halle, A., Feurtet-Mazel, A., 2019. Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 3746–3755. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04668-3>
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096–2105. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1997\)016<2096:BAMRIT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1997)016<2096:BAMRIT>2.3.CO;2)
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G., 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Environ.* 337, 265–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.07.009>
- Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environ. Pollut.* 220, 540–548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>
- Blanco, F., n.d. No Title.
- Bouwmeester, H., Hollman, P.C.H., Peters, R.J.B., 2015. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8932–8947. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090>
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M.P., Dawson, K.A., Papa, S., Canonico, B., Corsi, I., 2015. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* 111, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2006. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Langmuir* 22, 10994–11001. <https://doi.org/10.1021/la062072v>
- Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., Hollert, H., 2017. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1022–1031. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.156>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Colell, A., Green, D.R., Ricci, J.E., 2009. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death*

- Differ. 16, 1573–1581. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.137>
- Davranche, M., Veclin, C., Pierson-Wickmann, A.C., El Hadri, H., Grassl, B., Roweczyk, L., Dia, A., Ter Halle, A., Blancho, F., Reynaud, S., Gigault, J., 2019. Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. *Environ. Pollut.* 249, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.087>
- Day, F.A., Funk, A.E., Brady, F.O., 1984. In vivo and ex vivo displacement of zinc from metallothionein by cadmium and by mercury. *Chem. Biol. Interact.* 50, 159–174. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797\(84\)90093-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797(84)90093-0)
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K.A., Corsi, I., 2014. Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12302–12311. <https://doi.org/10.1021/es502569w>
- El Hadri, H., Gigault, J., Maxit, B., Grassl, B., Reynaud, S., 2020. Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments. *NanoImpact* 17, 100206. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100206>
- Freitas, R., Coppola, F., De Marchi, L., Codella, V., Pretti, C., Chiellini, F., Morelli, A., Polese, G., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2018. The influence of Arsenic on the toxicity of carbon nanoparticles in bivalves. *J. Hazard. Mater.* 358, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.056>
- Fries, E., Zarfl, C., 2012. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1296–1304. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0655-5>
- Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.M., Ray, P.C., Yu, H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* 22, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
- Galloway, T.S., 2015. Micro- and Nano-plastics and Human Health BT - Marine Anthropogenic Litter, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 343–366. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13
- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.Y., Gauffre, F., Phi, T.L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci. Nano* 3, 346–350. <https://doi.org/10.1039/C6EN00008H>
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19, 225–235. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-5670-x>
- Gonzalez-Fernandez, C., Tallec, K., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Suquet, M., Berchel, M., Paul-Pont, I., 2018. Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles. *Chemosphere* 208, 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.039>
- Haegerbaeumer, A., Mueller, M.T., Fueser, H., Traunspurger, W., 2019. Impacts of micro- and nano-sized plastic particles on benthic invertebrates: A literature review and gap analysis. *Front. Environ. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00017>
- Handy, R.D., Henry, T.B., Scown, T.M., Johnston, B.D., Tyler, C.R., 2008. Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish - A mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17, 396–409. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>
- Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environ. Pollut.* 160, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052>
- Hrenovic, J., Ivankovic, T., 2007. Toxicity of anionic and cationic surfactant to *Acinetobacter junii* in pure culture. *Cent. Eur. J. Biol.* 2, 405–414. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0029-7>
- Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., Silva-Cavalcanti, J.S., Araújo, M.C.B., 2014. Plastic debris retention and exportation by a mangrove forest patch. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.011>
- Jahan, K., Balzer, S., Mosto, P., 2008. Toxicity of nonionic surfactants. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 110, 281–290. <https://doi.org/10.2495/ETOX080301>
- Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.J., Lee, J.S., 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 8849–8857. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01441>
- Kägi, J.H.R., Schäffer, A., 1988. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry* 27, 8509–8515. <https://doi.org/10.1021/bi00423a001>

- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3315–3326. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069>
- 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, pp. 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Kögel, T., Bjørøy, Ø., Toto, B., Bienfait, A.M., Sanden, M., 2020. Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. *Sci. Total Environ.* 709, 136050. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136050>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., He, Z., 2013. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Lee, H., Shim, W.J., Kwon, J.H., 2014. Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1545–1552. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.023>
- Lemer, S., 2019. Assembled and translated transcriptomes. <https://doi.org/doi:10.7910/DVN/TQDJ5Y>
- Lenz, R., Enders, K., Nielsen, T.G., 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E4121–E4122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606615113>
- Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products - Screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74, 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.022>
- Lithner, D., Larsson, A., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci. Total Environ.* 409, 3309–3324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Liu, L., Fokkink, R., Koelmans, A.A., 2016. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to polystyrene nanoplastic. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1–6. <https://doi.org/10.1002/etc.3311>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, K., Qiao, R., An, H., Zhang, Y., 2018. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 202, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145>
- Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., Nienhaus, G.U., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Simmet, T., 2011. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano* 5, 1657–1669. <https://doi.org/10.1021/nn2000756>
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., Ji, R., 2016. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environ. Pollut.* 219, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>
- Magri, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Pompa, P.P., Fragouli, D., 2018. Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano* 12, 7690–7700. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01331>
- Manfra, L., Rotini, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., Corsi, I., 2017. Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.068>
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- Martin, C., Almahasheer, H., Duarte, C.M., 2019. Mangrove forests as traps for marine litter. *Environ. Pollut.* 247, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.067>
- Mayor, S., Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>
- Mohammed, A., Farrell, A.D., Gobin, J., Agard, J.B., 2014. Effects of freshwater flooding on mangroves in the Caribbean Region, in: *Flooding and Climate Change: Sectorial Impacts and Adaptation Strategies for the Caribbean Region*. Nova Publisher, pp. 73–96.
- Moreira, A., Figueira, E., Mestre, N.C., Schrama, D., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., Bebianno, M.J., 2018. Impacts of the combined exposure to seawater acidification and arsenic on the proteome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 203, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.021>
- Nicholls, C., Li, H., Liu, J.P., 2012. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin. Exp.*

- Pharmacol. Physiol. 39, 674–679. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>
- Nomura, T., Miyazaki, J., Miyamoto, A., Kuriyama, Y., Tokumoto, H., Konishi, Y., 2013. Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to functionalized polystyrene latex nanoparticles: Influence of surface charge on toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3417–3423. <https://doi.org/10.1021/es400053x>
- Okonko, D.O., Shah, A.M., 2015. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. *Nat. Rev. Cardiol.* 12, 6–8. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.189>
- Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Nili, H., de Montaudouin, X., 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquat. Toxicol.* 97, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.007>
- Pikuda, O., Xu, E.G., Berk, D., Tufenkji, N., 2019. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6, 21–25. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00614>
- Ralsler, M., Wamelink, M.M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E.A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H., Krobisch, S., 2007. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1186/jbiol61>
- Reed, S.M., Quelle, D.E., 2014. P53 acetylation: Regulation and consequences. *Cancers (Basel)*. 7, 30–69. <https://doi.org/10.3390/cancers7010030>
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159–169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>
- Rochman, C.M., Hentschel, B.T., The, S.J., 2014. Long-term sorption of metals is similar among plastic types: Implications for plastic debris in aquatic environments. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085433>
- Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T., Kaye, S., 2013a. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: Implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1646–1654. <https://doi.org/10.1021/es303700s>
- Rochman, C.M., Manzano, C., Hentschel, B.T., Simonich, S.L.M., Hoh, E., 2013b. Polystyrene plastic: A source and sink for polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13976–13984. <https://doi.org/10.1021/es403605f>
- Roesijadi, G., Brubacher, L.L., Unger, M.E., Anderson, R.S., 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00085-6)
- Rosety, M., Ordóñez, F.J., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, J.M., Rosety, I., Carrasco, C., Ribelles, A., 2001. Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (Sparus aurata L.) sperm. *Histol. Histopathol.* 16, 839–843. <https://doi.org/10.14670/HH-16.839>
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00789-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00789-0)
- Sirover, M.A., 2011. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810, 741–751. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.010>
- Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13689–13697. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>
- 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. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2027–2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>

- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W., Sawa, A., 2011. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.* 23, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>
- Velzeboer, I., Kwadijk, C.J.A.F., Koelmans, A.A., 2014. Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4869–4876. <https://doi.org/10.1021/es405721v>
- Venel, Z., Tabuteau, H., Pradel, A., El Hadri, H., Baudrimont, M., Gigault, J., n.d. Behavior of nanoplastics in relevant salinity gradient: experimental approach using lab-on-a-chip.
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>
- Yin, J., Deng, X., Zhang, J., Lin, J., 2018. Current Understanding of Interactions between Nanoparticles and ABC Transporters in Cancer Cells. *Curr. Med. Chem.* 25, 5930–5944. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180314122200>

CHAPITRE 4 : La technologie LIBD pour la détection de traces de nanoparticules

I Introduction

Dans le cadre du contrat de thèse CIFRE avec *Cordouan Technologies* un des objectifs était d'explorer les capacités analytiques de nouvelles technologies optiques pour des applications environnementales, et notamment la caractérisation de nanoparticules dans l'environnement. Parmi les différentes technologies comme la diffusion de lumière dynamique, la microscopie électronique, ou la Zétamétrie ; la détection de plasmas induits par laser (*Laser Induced Breakdown Detection*, LIBD) a pris une place importante, car cette technologie permet d'obtenir la taille et la concentration de particules entre 5 et 1000 nm, dispersées dans un liquide à des concentrations très faibles jusqu'à 10^3 particules mL^{-1} . Or, la concentration des nanoplastiques a été estimée à quelques ng L^{-1} dans l'environnement (Besseling et al., 2017a; Lenz et al., 2016). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la détection et la caractérisation des nanoplastiques dans les milieux naturel fait face à des limitations techniques analytiques, expliquant le peu de données que nous avons à leur sujet à l'heure actuelle. Le but de mon travail sur la LIBD a donc été d'explorer le potentiel de cette technologie pour détecter des nanoparticules à l'état d'ultra trace dans des milieux aqueux.

Dans un premier temps, deux types de laser aux caractéristiques différentes ont été comparés afin de déterminer s'il était possible de remplacer le laser originel du Magellan. Cette étude a également permis d'explorer la possibilité d'améliorer la sensibilité de l'instrument en augmentant la densité d'énergie, mais aussi la réduction du temps de mesure par en augmentant la fréquence laser. Dans un deuxième temps, la dépendance du signal par rapport au matériau des nanoparticules ou au milieu de dispersion a été étudiée.

II Matériels et méthodes

II.1 Laser Induced Breakdown Detection

II.1.1 La technologie

II.1.1.1 Principe

En termes de fonctionnement, un laser à impulsions fortement énergétique (jusqu'à plusieurs centaines de microjoules par impulsion) est focalisé au centre d'une cellule contenant les nanoparticules dispersées dans un liquide en faible concentration. Lorsqu'une particule traverse le spot laser, si l'énergie de l'impulsion est suffisante, un plasma est créé à la surface de la nanoparticule. L'onde acoustique générée est mesurée par un détecteur piézo-électrique et permet de déterminer la probabilité de détection de plasmas en fonction du niveau d'énergie apporté. L'analyse de ce résultat fournit une information sur la présence, la taille et la concentration des colloïdes.

La création d'un plasma à la surface des nanoparticules repose sur différentes étapes. Initialement, au moins un atome est ionisé par l'adsorption simultanée de plusieurs photons (ionisation multi-photonique), produisant des électrons "initiateurs" qui sont accélérés par effet *Bremsstrahlung* inverse dans le champ électrique du faisceau laser, comme illustré en Figure 72. Ces électrons entrent en collision avec les particules et atomes du milieu produisant des ions et d'autres électrons. Après plusieurs collisions successives, la densité de particules chargées libres augmente et induit une cascade d'ionisation en quelques nanosecondes. L'énergie emmagasinée est telle qu'il se produit un plasma (Walther et al., 2002).

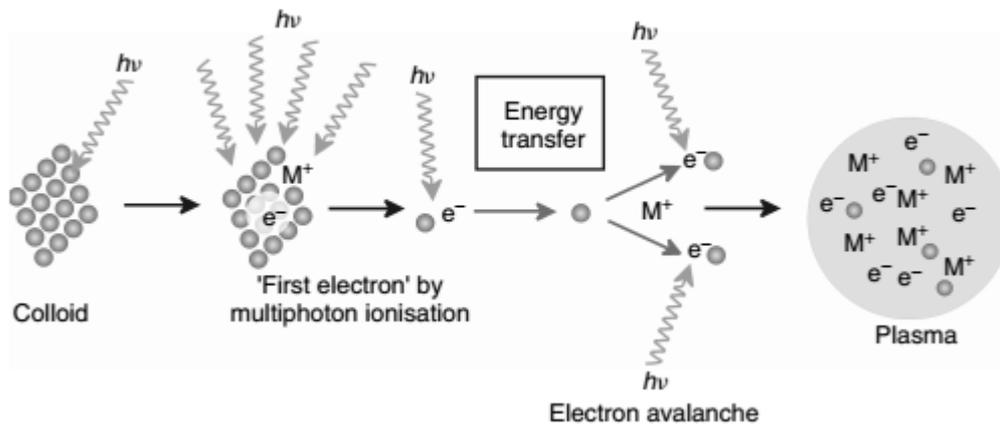


Figure 72: Processus de formation de plasma induits par un laser nano-seconde. (Kim and Walther, 2007)

L'onde acoustique produite par l'expansion thermique du plasma est ensuite captée par un détecteur piezo-acoustique accolé à la cuvette de mesure en quartz, afin de compter les particules. La Figure 73 montre le schéma des différents éléments de la LIBD.

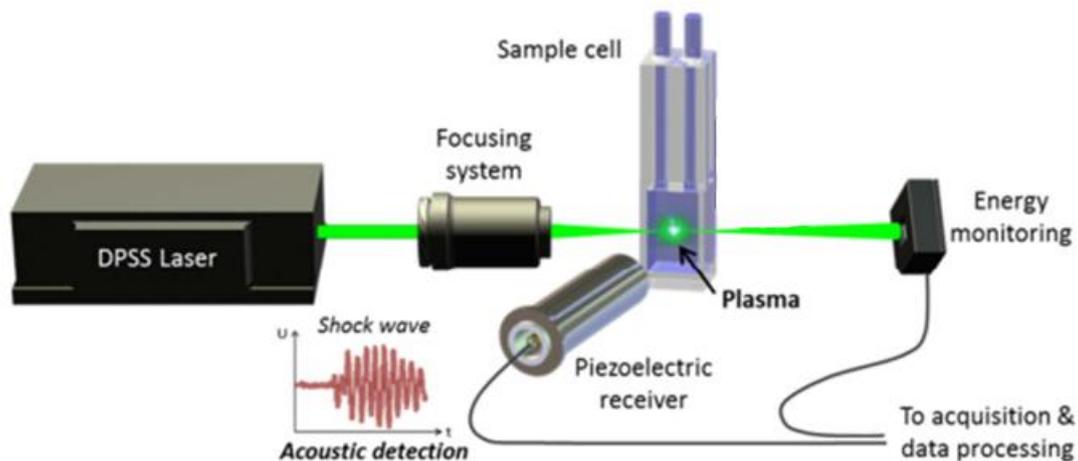


Figure 73: Schéma fonctionnel de la technologie LIBD (Cordouan Technologies)

Du fait que l'ionisation multiphotonique de la matière est un phénomène non linéaire (Walther et al., 2002), il est impossible d'obtenir un nombre précis de particules en mesurant le nombre de plasma. En effet, quand l'énergie du faisceau laser est suffisante pour créer un plasma, si plusieurs particules se trouvent dans le champ focal à ce moment-là, elles peuvent produire un plasma au même moment. Dans cette configuration, le détecteur acoustique n'est pas en capacité de différencier le son produit par une particule individuelle. Pour contourner ce

problème, c'est la probabilité de produire un plasma (*breakdown probability*, BDP) qui est calculé, en faisant le rapport du nombre d'évènement de plasma détectés sur le nombre d'impulsions laser (Scherbaum et al., 1996).

Afin obtenir des informations simultanées sur la concentration et la taille des particules, l'énergie des impulsions laser est augmentée progressivement, tandis que le nombre d'évènements de plasma est enregistré et converti en BDP (Walther et al., 2002). En pratique, la variation d'énergie délivrée par le laser est rendue possible par la rotation d'un atténuateur polarimétrique et l'énergie est estimée grâce une photodiode qui reçoit une partie du faisceau laser (Figure 73) (Scherbaum et al., 1996).

Pour le traitement des résultats, un graphique du BDP en fonction de l'énergie d'impulsion est obtenu sous la forme d'une courbe en S (Figure 74). Le seuil de la courbe donne des indications sur la taille moyenne des particules. Plus le seuil de la courbe en S est élevé, plus les particules sont petites. La pente de la courbe, quant à elle, informe sur la concentration moyenne des particules. Plus la pente est élevée plus la concentration est élevée (Walther et al., 2002).

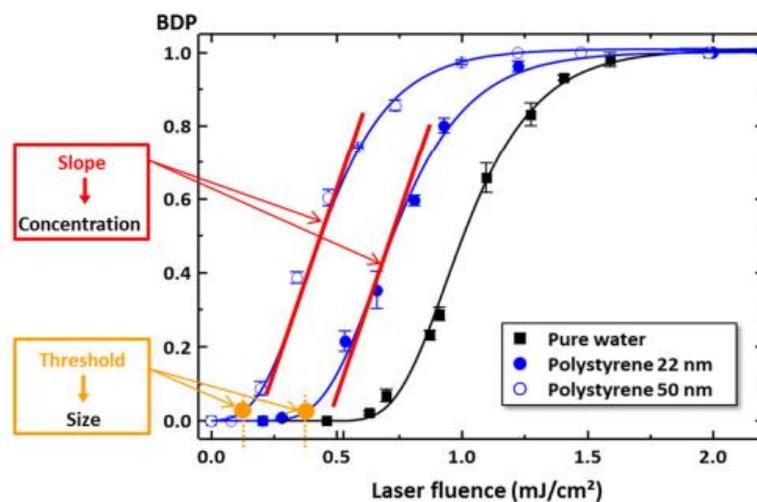


Figure 74: Courbes en S types : dispersions de billes de polystyrène latex 22 nm et 50 nm, et eau ultra pure. Ces courbes permettent d'estimer la concentration avec la pente, et la taille avec le seuil. (Cordouan Technologies).

La LIBD permet de détecter des particules en suspension dans un liquide car le seuil de détection des plasmas de matériaux solides est inférieur à celui des liquides, comme illustré sur la Figure 74. Il faut donc régler l'énergie du laser afin de se trouver en dessous du seuil de détection des plasmas induits par les molécules d'eau (ou le milieu de dispersion des particules).

La création de plasma dépend également des propriétés et de la nature des colloïdes, car l'apparition de l'électron initiateur dépend du nombre d'électrons ionisables à la surface des particules. La plupart des matériaux solides, dont le polystyrène, ont des énergies d'ionisation qui varient entre 6 et 10 eV dans les longueurs d'onde du visible. Cela implique que la génération de plasma nécessite l'adsorption simultanée de 4 photons (cf section I.1 en Annexe VI). Mais certains colloïdes, comme le dioxyde de thorium (ThO₂), ont une énergie d'ionisation inférieure et sont donc plus facilement détectés. Au contraire, les matériaux transparents comme la silice cristalline SiO₂ ou les colloïdes contenant beaucoup d'eau comme les bactéries par exemple, nécessitent plus d'énergie pour créer un plasma. En second lieu, l'apparition de plasmas dépend de la taille des particules, car il faut fournir plus d'énergie pour

créer un plasma sur une petite particule que sur une grosse (Scherbaum et al., 1996; Walther et al., 2002). La génération d'un plasma sur une particule nécessite un apport d'énergie très important de l'ordre de 10^8 W/cm². Pour fournir cette énergie, les lasers à impulsions sont les plus appropriés car ils ont plus de puissance que les lasers continus (Radziemski and Cremers, 1989). Plus les impulsions laser sont courtes, plus la puissance crête est importante, tout en limitant les effets thermiques. Afin de fournir la densité d'énergie adéquate, le faisceau laser est focalisé dans la cuvette de mesure (pour plus d'information sur les caractéristiques des lasers, se référer à l'Annexe VI).

De plus, la longueur d'onde du laser doit se trouver dans le spectre du visible, entre 600 et 700 nm, car c'est dans ce domaine que l'absorption multiphotonique est le processus principal pour la génération des plasmas (Wagner et al., 2005). Les lasers impulsionnels ont couramment une longueur d'onde native de 1064 nm, mais à cette longueur d'onde l'énergie requise pour faire un plasma est plus grande et l'eau absorbe d'avantage les rayonnements dans les infra-rouges. C'est pour cette raison que la longueur d'onde initiale est souvent divisée par deux par un cristal, pour obtenir une longueur d'onde de 532 nm (Wagner et al., 2005).

La technologie LIBD permet faire une mesure de taille et de concentration relative. En effet, les valeurs de taille et de concentration sont calculées à partir d'une calibration obtenue avec des particules de référence. De ce fait, la précision de la mesure dépendra de la qualité de la calibration réalisée en amont. Mais la disponibilité en particules calibrée dans différentes classes de taille dans la gamme nanométrique est limitée sur le marché. Les nanosphères de polystyrène latex sont les nanoparticules qui ont la plus grande gamme de taille disponible : entre 20 et 1000 nm. Pour des particules plus petites, il faudra se tourner vers les nanoparticules d'argent ou d'or, les oxydes de titane ou les oxydes de cérium. Pour évaluer la taille moyenne et la concentration moyenne de particules d'un échantillon, une calibration avec des particules de référence de même composition, avec des tailles et des concentrations connues, est préférable. Sinon il faudra tenir compte du fait que la variation du seuil peut être de 30% selon le matériau de la particule (Walther et al., 2002).

II.1.1.2 Conception, développement et applications de la technologie

Les premières expériences utilisant des plasmas induits par un laser, furent réalisées dans les années 60. Brech et Cross (1962) furent les premiers à utiliser la technologie *laser-induced breakdown spectroscopy* (LIBS) pour déterminer la composition de la matière grâce au contenu spectral des plasmas. (Kim and Walther, 2007). Contrairement à la LIBS qui utilise le spectre de lumière ainsi émis, le principe de la *Laser Induced Breakdown Detection* (LIBD) repose sur l'effet photo-acoustique. La matière qui absorbe la lumière, chauffe et génère *in fine* un plasma qui émet un signal acoustique. L'équipe de Kim découvre que le signal acoustique augmente linéairement avec l'intensité de la source de lumière. (Kim et al., 1990). Le Tableau 9 présente les découvertes qui ont permis de développer l'instrument tel qu'on le connaît aujourd'hui.

Tableau 9 : Historique du développement de la technologie LIBD

1980-1990	<ul style="list-style-type: none"> • Kitamori et son équipe démontrent que le nombre d'événements de plasma rapporté au nombre de tirs laser, est directement proportionnel à la concentration en colloïdes, avec une limite de détection de 100 particules cm^{-3} (pour des nanosphères de polystyrène de 38 nm) (Kim et al., 1990; Kitamori et al., 1989).
1990-2000	<ul style="list-style-type: none"> • Démonstration d'une relation de proportionnalité entre la BDP¹ et la taille des particules, en se basant sur des mesures d'eau ultrapure. (Fujimori et al., 1992) • Scherbaum et son équipe démontrent une relation de proportionnalité entre la BDP et l'énergie des impulsions laser permettant d'estimer la concentration en particules, et ils en déduisent un modèle statistique. (Scherbaum et al., 1996). • L'équipe de Izumida démontrent que la formation de plasmas sur des colloïdes métalliques (Or, Fer) nécessite moins d'énergie que sur des nanoparticules de polystyrène ou de silice (Izumida et al., 1998).
2000- aujourd'hui	<ul style="list-style-type: none"> • Depuis 2000, de nombreuses applications ont été développées (cf • Tableau 10)

¹ : BDP : probabilité de créer des plasmas (*breakdown probability*)

Tableau 10 : Domaines d'applications et couplages technologiques de la LIBD

Caractérisation de membranes de filtration (eau potable, ultrafiltration)	(Bundschuh et al., 2001; Troester et al., 2014; Wagner et al., 2003)
Suivi de réactions chimiques et de formations d'agrégats (oxydes de Zn, chlorure d'argent, complexes d'Eu(III), radionucléides)	(C. Bitea et al., 2003; Claudia Bitea et al., 2003; Bolz et al., 1996; Kim et al., 2018; Putri and Adawiah, 2018)
Devenir et le comportement des nanoparticules dans l'environnement (dans les sols, eaux souterraines, effluents de décharge)	(Delos et al., 2008; Kim and Walther, 2007; Plaschke et al., 2001; Stoll et al., 2017)
Détection de Bio-colloïdes (bactéries)	(Bundschuh et al., 2005)
Couplage avec le Fractionnement Flux-Force (<i>Flow Field-Flow Fractionation</i> , FFFF)	(Bouby et al., 2002; Thang et al., 2000)
Couplage	(Baik et al., 2007; Bouby et al., 2002)
- Spectroscopie UV visible	
- Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)	
Couplage	(Rothe et al., 2009)
- Spectrométrie d'absorption des rayons X	
- Spectrométrie de masse à temps de vol (ESI TOF-MS)	

Malgré les travaux de Bundschuh (Tableau 10), il est délicat de caractériser des organismes vivants unicellulaires (phytoplancton, bactéries, virus) car ils sont riches en eau et transparents dans le domaine du visible. Par conséquent si l'instrument basé sur la LIBD contient un laser émettant dans le visible, les photons seront peu absorbés et il sera difficile de créer des plasmas sur ces particules.

II.1.1.3 Approche expérimentale

Deux types de cuvettes de mesure en quartz peuvent être utilisés. La cuvette statique (aussi appelée *Static Cell*, SC) a un volume d'environ 3 ml (111-QS.10, Hellma) et permet de faire des mesures avec une faible quantité d'échantillon. Cependant, l'utilisation de cette cuvette peut induire un biais de mesure. En effet, le laser est focalisé en un point fixe dans la cuvette et le faisceau crée des plasmas sur la plupart des particules se trouvant dans le volume focal. Les résidus de particules peuvent s'accumuler dans ce volume car leur vitesse de diffusion est largement inférieure à la vitesse nécessaire pour sortir du volume focal ($= 65 \mu\text{m}^3$) entre deux impulsions laser (quelques nanosecondes). Ces résidus plus petits que les particules de l'échantillon peuvent donc générer des plasmas plus facilement et en nombre plus important. Ce phénomène induit des modifications sur le seuil de la Courbe en S. Ce problème peut être partiellement résolu en ajoutant un agitateur magnétique dans la cuvette. Néanmoins, une agitation magnétique pourrait créer des perturbations entraînant une ségrégation des particules dans l'espace en fonction de leur taille, et la formation de bulles.

La cuvette à circulation (aussi appelée *Flow Through Cell*, FC) permet d'analyser les particules en continu en faisant circuler un flux d'échantillon devant le faisceau laser. Les cuvettes couramment utilisées sont d'un volume de 275 μL (176.754-QS, Hellma). Le volume d'échantillon au point focal est renouvelé grâce à la mise sous flux via une pompe péristaltique. Le débit doit être réglé afin que le volume d'échantillon au point de focalisation soit renouvelé entre deux impulsions laser, afin de chasser les éventuels résidus de particules, les bulles de gaz et les radicaux libres créés par les plasmas.

Le temps de mesure pour obtenir une courbe en S pouvant aller jusqu'à deux heures pour des échantillons très dilués, le volume d'échantillon nécessaire peut devenir problématique. Afin de limiter la quantité d'échantillon nécessaire il est possible de travailler en circuit fermé. En effet la technologie LIBD est quasiment non destructive car seulement quelques particules passant dans un volume focal de $65 \mu\text{m}^3$ sont détruite. Si la quantité de particule contenue dans l'échantillon est supérieure à 10^6 , les quelques milliers de particules détruite lors de la mesure sont négligeable. Cela pourrait par contre poser problème pour les échantillons très dilués. En conséquence, il est conseillé de faire une mesure en circuit ouvert. (Walther et al., 2002).

II.1.1.4 Avantages et limites de la technologie

La LIBD est une technologie intéressante pour les applications environnementales. Le **Tableau 11** en présente les avantages et les inconvénients.

Tableau 11 : Avantages et inconvénients de la technologie LIBD

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Technologie très sensible, permet de détecter des particules jusqu'à 20 nm et jusqu'à 10⁴ part mL⁻¹. • Technique non invasive et presque non destructive, car une toute petite fraction (typiquement 10⁵ particules) de la quantité totale de particules de l'échantillon est détruite (Walther, 2003). • Ne nécessite pas, ou peu, de préparation d'échantillon et il est possible d'effectuer des mesures rapides à partir d'une faible quantité de solution • Mesures réalisables en continue. Permet de faire de la surveillance en temps réel (Kim and Walther, 2007). • Mesures réalisables <i>in situ</i> en utilisant une cuvette à circulation. Utile dans les conditions difficile : liquide sous vide/sous pression, échantillon radioactif... (Kim and Walther, 2007). 	<ul style="list-style-type: none"> • les petites particules peuvent être masquées par des particules de taille supérieure (du fait de leur seuil inférieur)¹. • les plasmas sont plus difficiles à produire sur les particules transparentes à la longueur d'onde du laser (532 nm) (nanoparticules de silice, bio-colloïdes contenant une grande quantité d'eau (bactérie, virus, spores)...)) • détecte la moindre contamination de par la sensibilité élevée

¹ : Si la concentration en petite particule est particulièrement grande par rapport à la concentration en grosses particules, la courbe en S comportera deux pentes dans sa partie linéaire.

Les limites de détection de la LIBD dépendent en grande partie de la taille des particules, car la probabilité de détecter une particule dans le volume focal diminue quand les particules deviennent plus petites. Ceci s'explique car la densité énergétique est plus importante au centre du volume focal, qu'en périphérie (voir Figure 113 en section I.4 de l'Annexe VI). Comme il est nécessaire de fournir plus d'énergie pour créer un plasma sur les petites particules, il y a donc plus de chance que l'évènement se produise au centre du volume focal. Ainsi le volume efficace peut être estimé à $\pi r^2 z \approx 10^{-6} \text{ cm}^3$ pour les petits colloïdes, avec r le rayon du faisceau laser et z la largeur du volume focal efficace. Pour des particules de 1000 nm le volume focal efficace est 10 fois plus grand que pour des particules de 20 nm (Kim and Walther, 2007).

Le conditionnement des échantillons doit être rigoureux et effectuée dans des conditions de propreté drastiques car cette technologie permet de détecter des ultra-traces de nanoparticules. En effet, il est important que les échantillons ne soient pas pollués, surtout lorsque leur concentration en particule d'intérêt est très faible, car la moindre impureté sera détectée et entrainera un biais dans les résultats. Pour cela, la verrerie doit être la plus inerte possible vis à vis des solutions qu'elle doit contenir, afin d'éviter toute sorption de surface ou le relarguage de particules. Il est recommandé d'utiliser de la verrerie en Teflon (perfluoro-alcoxy, PFA) et des tuyaux en polyétheréthercétone (PEEK) et en Tygon®. Toute la verrerie doit être extrêmement propre et doit être nettoyée à l'acide nitrique (3 %) puis méticuleusement rincée à l'eau ultra-

pure (résistivité de $18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$ et Carbone organique total = $3\text{-}5 \mu\text{g L}^{-1}$), et séchée sous une hotte à flux laminaire. La préparation des échantillons doit être effectuée elle aussi sous une hotte à flux laminaire.

II.1.1.5 Le Magellan™ de Cordouan Technologies

Au début des années 2010 Cordouan Technologies a collaboré (transfert technologique) avec le *Karlsruhe Institute of Technology* (KIT) pour co-développer un instrument LIBD. L'instrument nommé Magellan™ est conçu pour être compact et robuste pour une utilisation aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire. C'est actuellement l'unique instrument commercial sur le marché utilisant cette technologie. Le laser à la base de l'instrument comporte des avantages non négligeables par rapport aux montages des laboratoires de recherche. Tout d'abord c'est un laser à impulsion Nd :YAG compact dont la tête mesure $16 \times 9 \times 4 \text{ cm}$, ce qui est avantageux par rapport aux autres lasers de ce type qui font en général 40 à 70 cm de long et peuvent peser jusqu'à plusieurs dizaines de kilogrammes. Cela permet de produire un instrument avec des dimensions de $60 \times 40 \times 40 \text{ cm}$, qui prend un minimum de place sur une paillasse et qui rend le Magellan transportable sur le terrain (**Figure 75**). Ce laser est également plus performant que les autres configurations existantes qui ont en générale des durées d'impulsion de 3 à 14 nanosecondes, et des fréquences entre 10 et 30 Hertz. Le laser du Magellan (Flare NX 515, Coherent) possède également une énergie plus stable, une faible divergence de faisceau, une meilleure sensibilité aux petites particules ainsi qu'une mesure jusqu'à 10 fois plus rapide. Ceci grâce à des impulsions plus courtes ($1,24 \text{ ns}$) à plus haute fréquence (100 Hz) et avec une plus haute énergie (voir Annexe V).

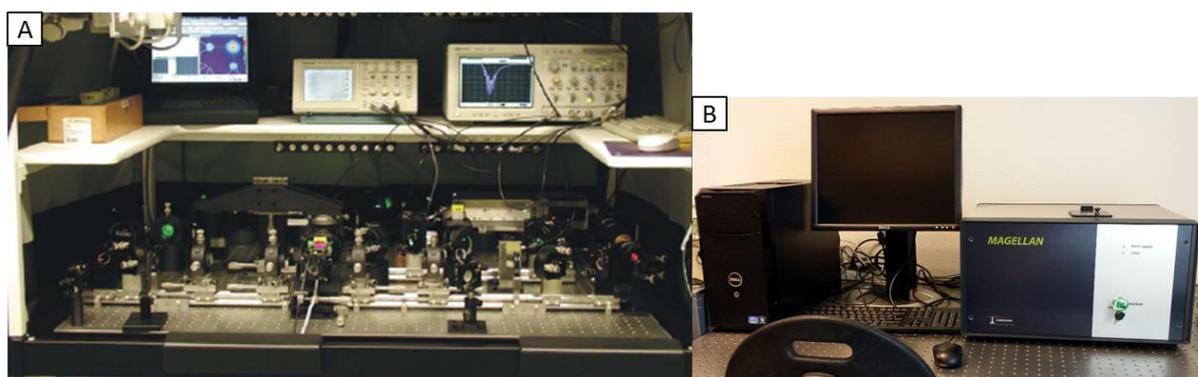


Figure 75 : A : Banc optique du laboratoire du KIT. B : Photographie du Magellan

II.2 Protocole d'obtention d'une courbe en S

L'instrument est le Magellan fabriqué en 2017 chez Cordouan technologies, comportant un laser Flare 532 (Coherent) à la fréquence de 100 Hz ou un Flare NX 515 (Coherent) à la fréquence de 150 Hz (le modèle de laser sera précisé au cas par cas). La cuvette de mesure utilisée est une cuvette à circulation en quartz ($176.754\text{-}QS$, Hellma) reliée à une pompe péristaltique (*high precision multichannel dispenser*, Ismatec) par des tuyaux en PEEK (IDEX Health & Science) et en Tygon (Ismatec), dont le débit est réglé sur 4 ml min^{-1} . Pendant les mesures de courbe en S, la circulation d'échantillon se fait en circuit fermé afin d'économiser la quantité de l'échantillon (la durée d'obtention d'une courbe en S varie entre 10 min et 2 h). La

LIBD technologie étant très peu destructive cela ne pose pas de problème pour des concentrations en particules supérieures à 10^6 part mL^{-1} (Kim and Walther, 2007).

Les points des courbes en S sont obtenus en haute résolution : les évènements de plasmas sont mesurés pendant 2000 impulsions laser par point, et l'incrément en énergie entre chaque point est équivalent à l'écart type du point précédent. Chaque échantillon est mesuré 3 fois et les courbes en S sont moyennées par interpolation linéaire (utilisation de l'algorithme de OriginPro 2015 : « *average multiple curves* » en mode interpolation linéaire). Le seuil énergétique d'une courbe en S est déterminé quand les BDPs dépassent la valeur de 0,01 selon la méthode de Walther et al. (2002). Les pentes sont calculées dans la partie linéaire de la courbe en S.

Une mesure d'eau ultra pure dégazée est réalisée avant chaque «campagne de mesure d'échantillon» afin de s'assurer que le système à circulation est propre, pour s'assurer que le système optique est opérationnel et pour avoir une courbe en S d'eau ultra pure de référence.

II.3 Préparation d'échantillon

La préparation et le stockage des échantillons se fait dans de la vaisselle en PFA. L'ensemble de la vaisselle est initialement lavée à l'acide nitrique (2%) puis rincée 10 fois à l'eau ultra pure. La vaisselle est ensuite rincée à l'eau ultra pure entre deux dispersions de nanoplastiques différentes. Soit un rinçage de 10 volume d'eau pour la vaisselle « statique » (fioles jaugées, flacons, bouteilles...) et un passage d'un litre d'eau ultra pure dans la cuvette à circulation, avec un débit de 15 ml min^{-1} (débit maximum de la pompe péristaltique). Il est nécessaire de dégazer l'eau ultra pure car la présence de nano-bulles pourrait obstruer le faisceau et perturber la création de plasma (Kim and Walther, 2007). L'eau ultra pure est dégazée en faisant reposer l'eau dans une bouteille en PFA ouverte pendant une nuit sous la hotte à flux laminaire.

Les échantillons sont préparés sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination. Les dispersions de nanoparticules sont réalisées en utilisant de l'eau ultra pure dégazée. Les nanoparticules de référence servant pour la calibration du Magellan sont des latex de polystyrène (PSL) standard certifiées NIST (*NIST-traceable Thermo Scientific Nanosphere Size Standard*, Fremont, USA) de diamètre 20-900 nm. Leur diamètre hydrodynamique est également mesuré avec la technologie *dynamic light scattering* (DLS *in situ*, Vasco flex, Cordouan Technologies, Pessac, France) et le potentiel zêta est évalué à $\zeta = -22$ à -35 mV par la zétamétrie (Wallis, Cordouan Technologies, Pessac, France)

III Résultats et discussion

III.1 Étude comparative des lasers du Magellan

Initialement le laser intégré dans le Magellan était un laser à impulsion Nd:YAG, de dimension compact, fabriqué par Innolight : le Flare 532 (Flare 532-40-100). Au cours de cette thèse un nouveau laser aux caractéristiques intéressantes a été étudié : le laser Flare NX.

La première étape avant d'intégrer le laser dans le Magellan est de mesurer les valeurs précises des principales caractéristiques du faisceau : le diamètre du faisceau, la valeur de l'énergie maximum, la valeur de la puissance crête, la stabilité en énergie au cours du temps, la qualité

du spot (profil gaussien, absence de points chaud) et le dépointé du faisceau au cours du temps. Dans un deuxième temps, une comparaison des mesures de nanoparticule est nécessaire afin d'évaluer l'efficacité du nouveau laser pour mesurer la taille et la concentration en particule dans une dispersion. Des bases d'optiques sont incluses en Annexe VI, expliquant les caractéristiques des lasers ainsi que les termes, les éléments et instruments optiques utilisés dans cette étude.

III.1.1 Vérification/mesure des caractéristiques du nouveau laser

III.1.1.1 Les lasers

Le premier laser du Magellan, le Flare 532 (Flare 532-40-100), est de longueur d'onde 532 nm, avec des impulsions de 2 nanosecondes, une fréquence de 100 Hertz et une énergie maximum par impulsion de 400 μ J. Le laser Flare NX a des caractéristiques proches du laser précédent : dimensions compactes, 515 nm de longueur d'onde, impulsions de 1,2 nanosecondes, énergie maximum par impulsion de 307 μ J, et une fréquence ajustable jusqu'à 2000 hertz. Il est réputé pour être plus stable en énergie, avoir un faisceau moins divergent et parfaitement gaussien (TEM 00) par rapport au Flare 532. Les caractéristiques des deux lasers sont résumées en Annexe V.

III.1.1.2 Stabilité en énergie

La valeur d'énergie par impulsion maximale du faisceau laser est importante car elle permet d'évaluer l'efficacité du laser pour créer des plasmas. Si l'énergie annoncée par la fiche du constructeur est en théorie suffisante pour créer des plasmas dans l'eau, il faut le vérifier avant d'introduire définitivement le laser dans l'instrument. L'énergie est dans un premier temps mesurée avec un minimum d'optiques devant le faisceau. Une fois que le laser sera inclus dans le Magellan, l'énergie du faisceau laser entrant dans la cuvette de mesure sera atténuée par les différents éléments optiques présents dans l'instrument.

Afin d'évaluer la valeur d'énergie maximale et la stabilité en énergie au cours du temps, l'énergie du laser a été mesurée à la puissance maximale à différentes fréquences pendant 4 minutes, en utilisant un capteur de puissance (*High Sensitivity Thermal Laser Sensor 3A-P*, Ophir). Les valeurs d'énergie (Joules) ont été calculées en divisant la puissance mesurée par la fréquence des impulsions.

L'énergie par impulsion moyenne change selon la fréquence comme le montre la **Figure 76**, et varie entre 284 et 320 μ J. Cependant l'énergie semble être instable aux fréquences de 100 Hz et 500 Hz, car les valeurs des énergies maximales sont respectivement supérieures aux valeurs d'énergie moyennes de 1,05 % et de 2,94 %, alors qu'aux autres fréquences, l'écart entre la moyenne et la valeur maximum est en moyenne de 0,36 %.

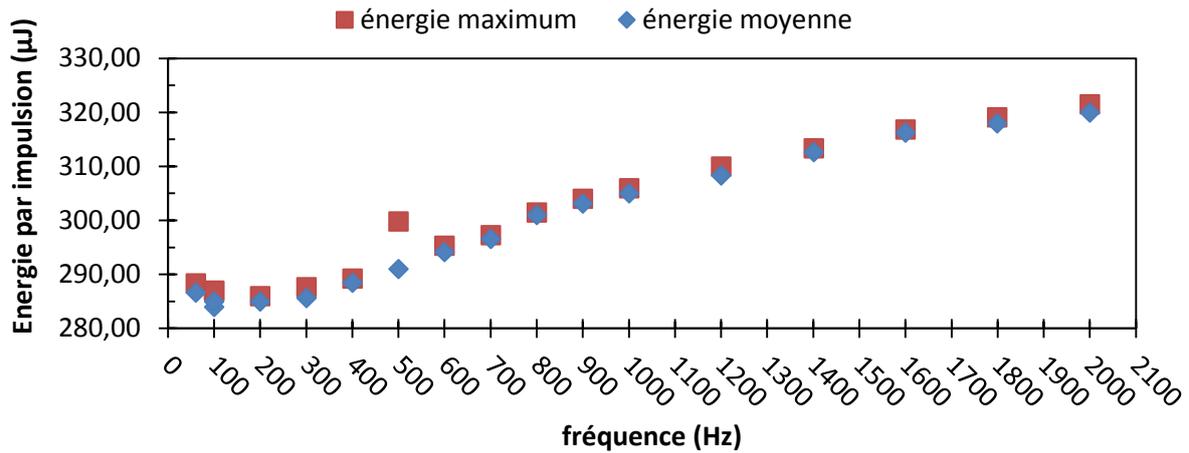


Figure 76 : Moyenne sur 4 minutes et valeur maximales de l'énergie par impulsion (µJ) obtenue selon la fréquence laser (Hertz).

Pour avoir les caractéristiques les plus proches de l'ancien laser du Magellan : le « Flare 532 », choisir une fréquence proche de 100 Hz serait appropriée. La stabilité de l'énergie par impulsion est alors mesurée durant 8 heures à 100 Hz. L'instabilité en énergie observée sur les 4 min de mesure représenté en **Figure 76**, s'avère encore plus importante sur 8 heures (**Figure 77**). En effet, l'énergie par impulsion fait des « sauts » d'environ 10 µJ pendant des durées variant entre 30 min et 2 heures et des plus petits « sauts » d'environ 5 µJ de 3 secondes. Comme la technologie LIBD nécessite une stabilité en énergie la plus importante possible, nous changeons la fréquence pour 150 Hz. À cette fréquence l'énergie est bien plus stable et ne varie que de 4-5 µJ durant les 8 heures de mesure (**Figure 78**). La fréquence de 150 Hz est donc sélectionnée pour les futures mesures dans le Magellan.

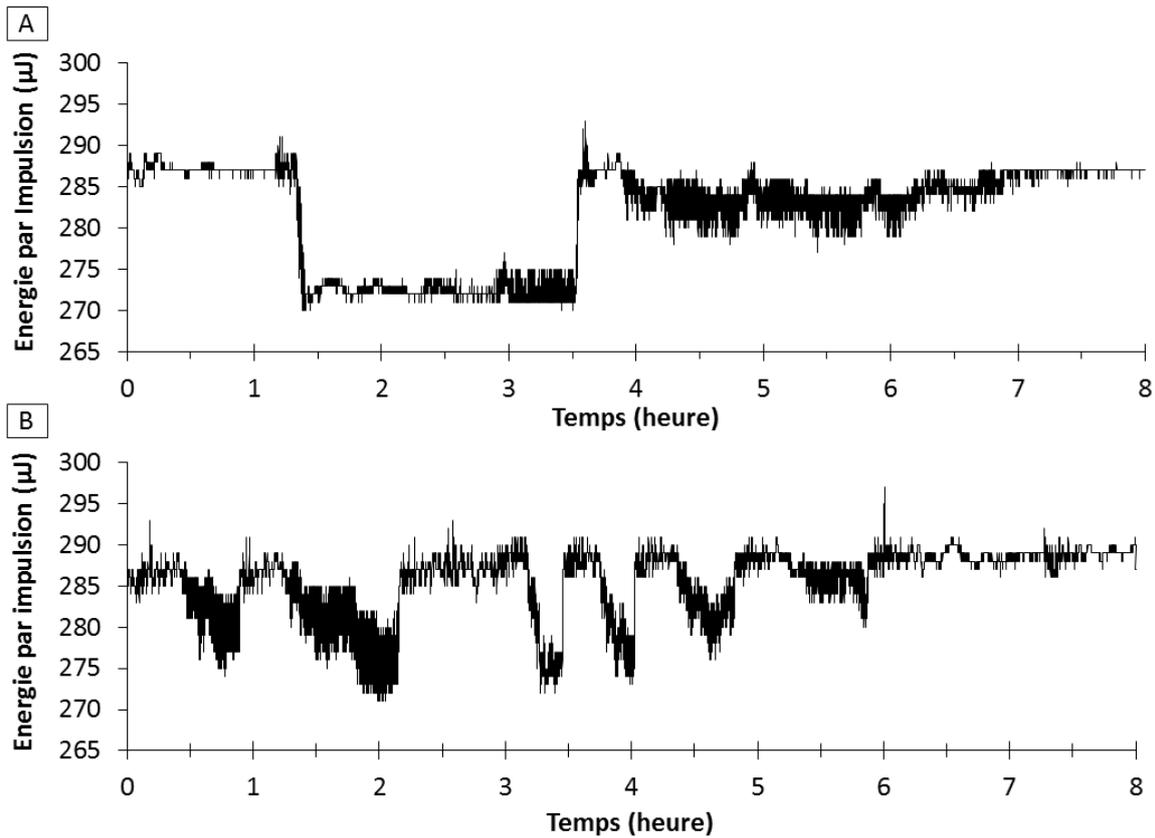


Figure 77 : A : Énergie par impulsion (µJ) mesurée pendant 8 heures après allumage à la fréquence de 100Hz. B : Mesures répétées à 24h d'intervalle de la première, après extinction du laser pendant 12h.

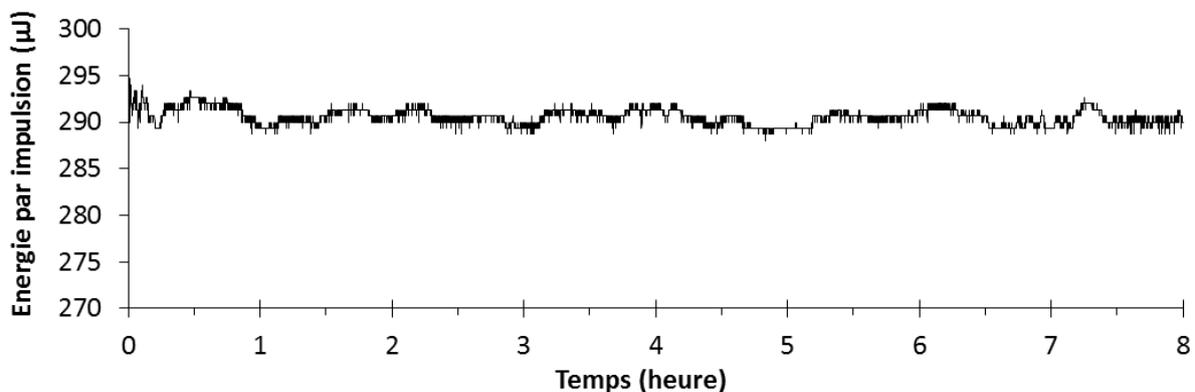


Figure 78 : Énergie par impulsion (µJ) mesurée pendant 8 heures après allumage à la fréquence de 150Hz

III.1.1.3 Profil du faisceau

Afin de mesurer le diamètre du faisceau ($1/e^2$), de s'assurer que la répartition d'énergie du faisceau est bien gaussienne (TEM 00) et exempt de points chaud. Sans cela, la probabilité de créer des plasmas serait biaisée quand on augmente l'énergie laser, car la répartition d'énergie au point focal ne serait pas homogène. Une camera CCD (WinCamD, Data Ray) est utilisée (cf section II dans l'Annexe VI). La répartition spatiale de l'intensité du faisceau est mesurée à la puissance maximale à différentes fréquences. Afin de ne pas saturer le capteur, l'énergie du faisceau est atténuée grâce à des filtres à densité neutre et d'un atténuateur composé d'un cube

polariseur et d'une lame demi onde. La camera est placée dans la zone de Rayleigh afin de vérifier le rayon du *waist* (w_0) et à une distance de 50 cm du *waist*, zone où se situe la première lentille dans le Magellan. Les notions principales sur la forme et la propagation des faisceaux laser sont introduites dans les sections I.4 et I.5 de l'Annexe VII. Les valeurs de rayon du faisceau laser w sont calculée selon l'équation 15 avec z la distance depuis le *waist*, et λ la longueur d'onde.

$$w(z) = w_0 \sqrt{\left(1 + \frac{z\lambda}{\pi w_0^2}\right)^2} \quad \text{Équation 15}$$

La divergence théorique peut être calculée selon l'équation 16.

$$\theta_{theo} = M^2 \frac{\lambda}{\pi w_{0theo}} \quad \text{Équation 16}$$

La divergence réelle est par le biais de la trigonométrie selon la Figure 79. Le rapport de la divergence théorique sur la divergence mesurée permet d'obtenir la valeur du M^2 (Équation 17)

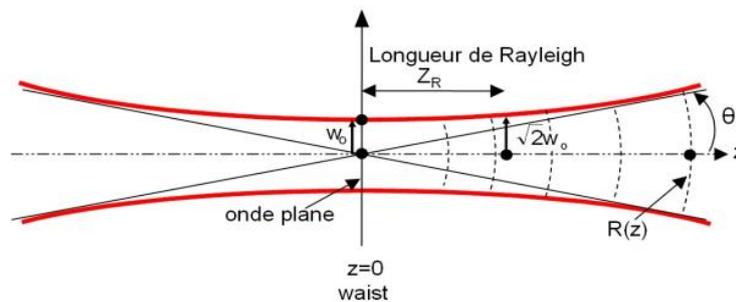


Figure 79 : schéma de propagation d'un faisceau gaussien

$$M^2 = \frac{w_{0m} \theta_m}{w_{0theo} \theta_{theo}} \quad \text{Équation 17}$$

Les valeurs calculées et théoriques des diamètres, divergence et M^2 sont résumées dans le **Tableau 12**. Le diamètre du faisceau ($1/e^2$) mesuré à 150 Hz est de $w_{0m} = 183 \mu\text{m}$ contre une valeur théorique de $w_{0t} = 173 \mu\text{m}$ annoncée par le constructeur pour 2000 Hz. À $z = 50 \text{ cm}$ on obtient une valeur de $w_{(50\text{cm})m} = 870 \mu\text{m}$ contre $w_{(50\text{cm})t} = 643 \mu\text{m}$ calculé avec les valeurs données par le constructeur.

Ces valeurs de diamètre à deux distances du *waist* nous permettent de calculer la divergence, et d'obtenir une valeur de $\theta = 1,08 \text{ mrad}$. Avec la valeur théorique de la divergence donnée par constructeur ($\theta_{theo} = 0,94 \text{ mrad}$), nous pouvons calculer une valeur de M^2 de 1,21.

Tableau 12 : comparaison des caractéristiques théoriques et mesurée du laser flare 515.

	Valeurs théoriques constructeur (à 2000 Hz)	Valeur mesurée (à 150 Hz)
Diamètre du faisceau au <i>waist</i> (μm)	173	183
Diamètre du faisceau à $z = 50 \text{ cm}$ (μm)	643	870
Divergence 2θ (mrad)	1,88	2,16
M^2	1,00	1,15

Compte tenu des valeurs mesurées, il apparaît que les valeurs fournies par le constructeur sont données en sa faveur. Le constructeur garantit un M^2 de 1,00 ce qui est aberrant et signifierai que la réalité est similaire au cas parfait. Il est donc important de réaliser les mesures par soi-même afin de pouvoir connaître les caractéristiques réelles du laser. Les valeurs obtenues sont différentes de celles données par le constructeur, et le faisceau est plus divergent que la théorie, mais les valeurs obtenues sont dans la norme de ce que l'on peut attendre pour un laser de cette gamme. Les valeurs sont tout à fait acceptables pour notre application, et n'entraîneront pas de problèmes pour focaliser le laser dans la cuvette de mesure et créer des plasmas.

Le profil d'intensité du faisceau montre une distribution gaussienne exempte de point chaud (**Figure 80**).

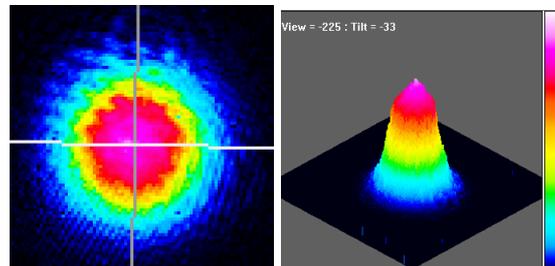


Figure 80 : profil d'intensité du faisceau laser à 150 Hz

III.1.1.4 Étude du pointé du laser

Il est normal qu'un faisceau laser dépointe légèrement pendant le préchauffage de la cavité, mais il est important de connaître la déviation dans l'espace du faisceau afin d'estimer si le faisceau passera bien au contre les lentilles dans le trajet optique. Cette précaution permet d'éviter l'apparition défauts optiques sur le faisceau. Une section est consacrée au préchauffage et au pointé du laser dans l'Annexe VI

Le trajet du faisceau laser est suivi au cours du temps grâce à une caméra (acA2500-14gm, BASLER), un diaphragme à iris sur le trajet du faisceau et une lentille de focale $f=300 \text{ mm}$, ce qui permettra d'évaluer le dépointé latéral ainsi que le dépointé angulaire. L'énergie du faisceau est diminuée grâce à un atténuateur, composé d'un prisme de Glan et d'une lame de retard demi-onde, afin de pas altérer la camera. L'acquisition commence 30 min après allumage du laser afin que les optiques préchauffent, puis pendant 7 heures à la puissance maximale et à la

fréquence de 150 Hz. Les différents outils optiques utilisés dans cette partie sont détaillés dans la section II de l'Annexe VI.

Les coordonnées x et y du pointé du faisceau sur le capteur de la camera sont récupérées au cours du temps. La déviation latérale $[A'B']$ est calculée selon l'équation 18 et la déviation angulaire θ selon l'équation 19 et l'équation 20. Le montage et les notations utilisés sont illustrés dans la **Figure 81**.

$$[A'B'] = (\Delta x'^2 + \Delta y'^2)^{1/2} \quad \text{Équation 18}$$

$$\theta = \frac{[AB]}{\text{longueur focale}} \quad \text{Équation 19}$$

$$[AB] = (\Delta x^2 + \Delta y^2)^{1/2} \quad \text{Équation 20}$$

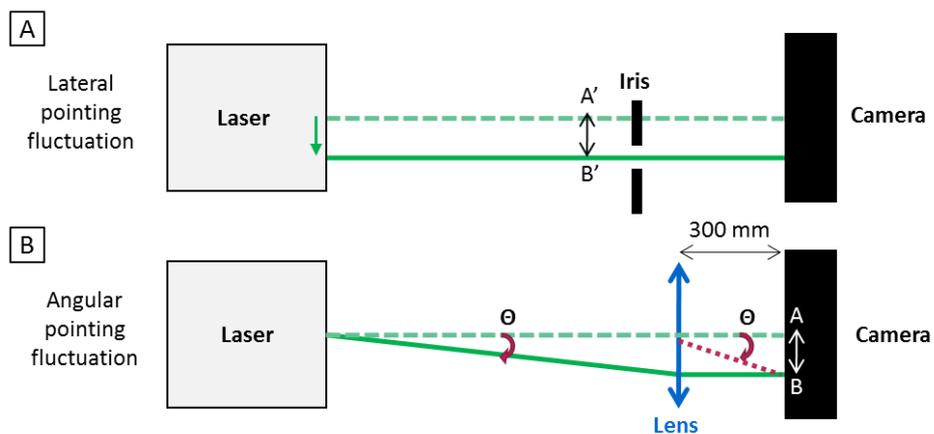


Figure 81 A : schéma d'une déviation latérale du faisceau laser (ligne verte), $[A'B']$ représente la distance de déviation latérale. B : schéma d'une déviation angulaire, $[AB]$ représente la distance de déplacement du faisceau sur l'écran de la caméra. θ représente l'angle de divergence.

Durant les 7 heures de mesure le faisceau s'est déplacé d'environ 1 mm sur l'écran de la camera (**Figure 82**). Le déplacement le plus important se produit sur les 4 premières heures à raison de 0,215 mm par heure en moyenne (**Figure 82**). Ce mouvement correspond à un déplacement latéral de 1,09 mm et un déplacement angulaire de 563,4 mrad (soit 2,252 mm sur les 4 m de trajet optique) sur le total des 7 heures (**Figure 83** et **Figure 84**).

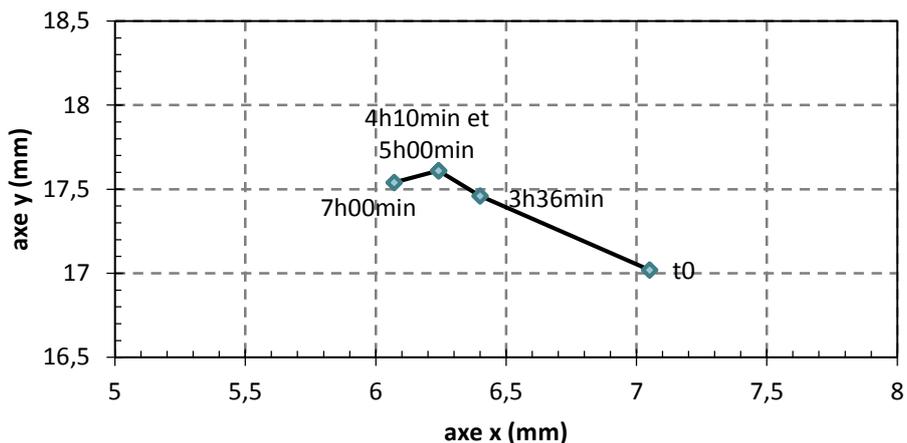


Figure 82 : déplacement du pointé du faisceau laser sur l'écran de la caméra pendant 7 heures.

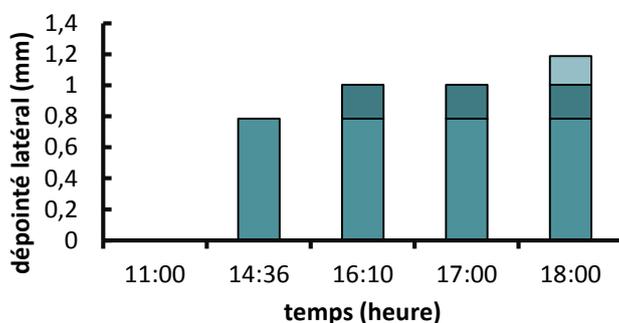


Figure 83 : Évolution du dépointé latéral au cours du temps sur 7 heures.

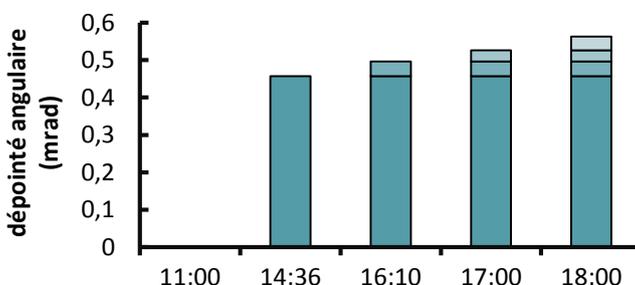


Figure 84 : Évolution du dépointé angulaire au cours du temps sur 7 heures.

Dans le Magellan, le point de focalisation dans la cuvette de mesure se trouve à une distance de 47,8 cm de la tête laser. À cette distance, le pointé du faisceau se déplace de 1,09 mm en dépointé latéral et de 0,027 mm en dépointé angulaire, sur 7 heures d'utilisation. Un tel dépointé pendant une mesure pourrait entraîner des aberrations chromatiques et une mauvaise focalisation car les éléments optiques ne seront plus alignés correctement par rapport au trajet optique. Cela entraînerait des variations dans la densité d'énergie au point focal, et donc une mauvaise reproductibilité de la création des plasmas à une énergie donnée sur un échantillon donné. Par ailleurs, la fenêtre de mesure de la cellule à circulation est large de seulement 2,5 mm, donc un dépointé de 1 mm pourrait endommager la cuvette de mesure.

Les caractéristiques du laser respectent les valeurs d'usine, sauf la stabilité en énergie à la fréquence de 100 Hz, mais qui peut être solutionné en réglant la fréquence sur 150 Hz. Ce laser peut donc être inclut dans le Magellan et afin de faire les premiers tests de création de plasma dans de l'eau ultra pure et sur des dispersions de nanoparticules.

Le temps de préchauffage des éléments optiques et de la cavité laser doit être pris en compte pour aligner les éléments optiques dans le Magellan et pour faire une mesure fiable. En conséquence l'alignement des optiques est réalisé après les 7 heures de préchauffage. Si l'instrument n'est pas déplacé, l'alignement ne se fait qu'une fois et n'a pas besoin d'être réajusté dans le temps.

III.1.2 Effet du changement de laser sur les courbes en S

Le nouveau laser Flare Nx a des caractéristiques proches de l'ancien laser du Magellan mais cependant différentes. À cause du changement de longueur d'onde, l'énergie des photons du Flare NX est augmentée et passe de 2,33 eV à 2,40 eV. Le nouveau laser a une énergie par impulsion plus faible mais une durée d'impulsion plus courte que l'ancien laser. En conséquence la puissance crête passe de 200 kW à 247 kW. L'intensité au niveau du point focal dans la cuvette de mesure augmente tout en restant dans le même ordre de grandeur et passe de $1,02 \cdot 10^{12}$ à $1,26 \cdot 10^{12}$ W cm⁻². En conséquence, il est possible que le seuil de claquage, *i.e.* l'énergie à partir de laquelle des événements de plasma apparaissent, soit différent avec le nouveau laser sur un même échantillon. Pour répondre à cette question de l'eau ultra pure dégazée ainsi que des PSL standards de 100 ± 3 nm et 30 ± 3 nm dispersés dans de l'eau ultra pure dégazée à la concentration de 10^{10} particule mL⁻¹, sont mesurées avec le Magellan (**Figure 85**).

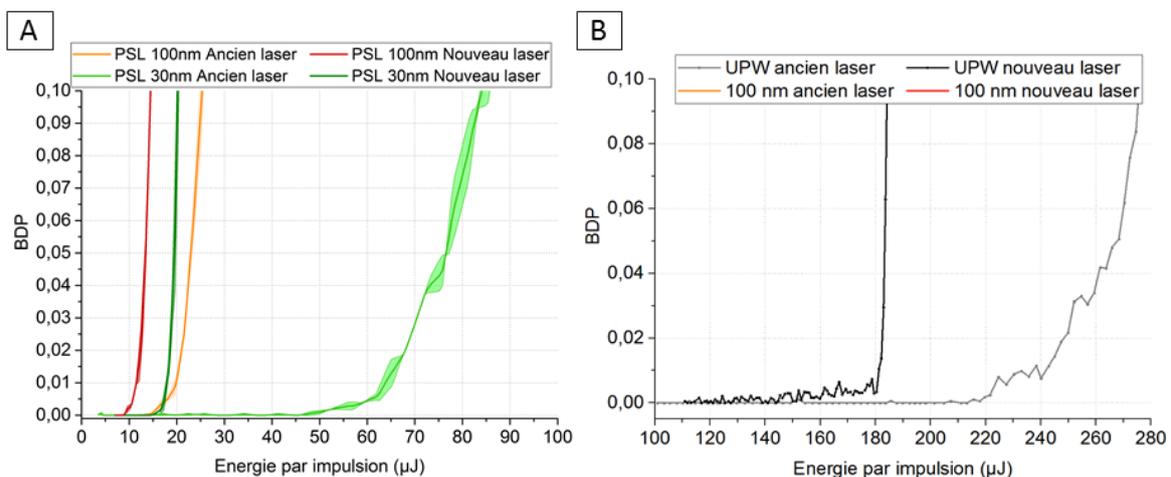


Figure 85 : Comparaison de courbes en S mesurées avec le Flare 532 (ancien laser) et le Flare Nx 515 (nouveau laser). A : PSL de 30 et 100 nm. B : eau ultra pure. Moyennes ± écart type.

Avec le nouveau laser, les seuils de l'eau ultra pure et PSL sont à des énergies inférieures à ceux obtenus avec l'ancien laser (**Tableau 13**). On peut donc conclure que le Flare Nx est plus efficace pour créer des plasmas sur les PSL et sur l'eau ultra pure.

Tableau 13 : seuils de l'eau ultrapure, et des PSL 30 et 100 nm obtenus avec l'ancien et le nouveau laser

	Seuil de l'eau ultra pure	PSL 30 nm	PSL 100nm
Ancien laser	241 μJ	20 μJ	63,7 μJ
Nouveau laser	181 μJ	17,8 μJ	11,3 μJ

Mais en conséquence, la mesure de grosses particules est délicate car les seuils des courbes en S sont décalés vers les basses énergies. Cela est confirmé par la Figure 86 : les courbes en S des PSL de 900 et 500 nm, bien que de concentration plus faible que les autres PSL du graphique, montrent que les plasmas commencent à apparaître dès 2 μJ .

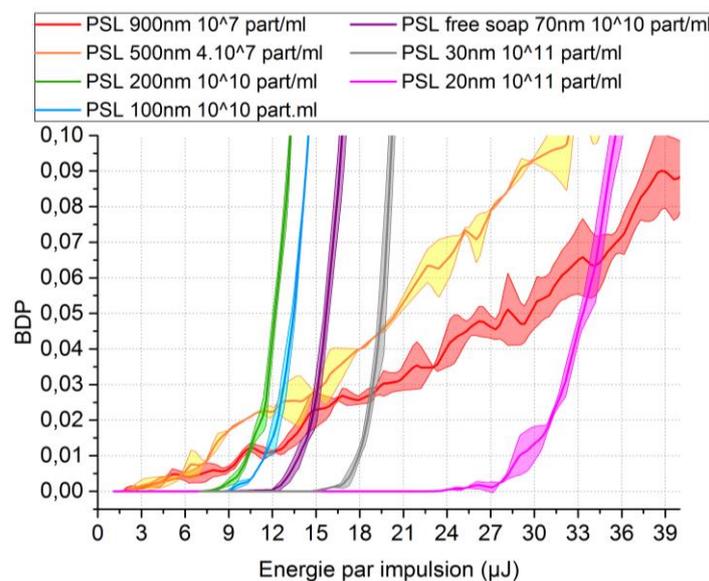


Figure 86 : Courbes de calibration obtenues avec le Flare Nx, avec différentes tailles de PSL : 900; 500 ;200 ;100 ;30 et 20 nm et des PSL free soap de 70 nm. Moyennes \pm écart type.

Par ailleurs, l'intervalle en énergie entre les seuils de particules de PSL 100 nm et 30 nm est rétréci : il passe de 43,7 μJ avec l'ancien laser à 6,5 μJ avec le nouveau laser (Figure 85, Tableau 13). Cet écart entre les seuils pour différents diamètres de PSL devient de plus en plus important quand la taille des nanoparticules diminue. En effet, l'écart entre des PSL de 200 nm et 100 nm est de 1,2 μJ alors que l'écart entre des PSL de 20 nm et 30nm est de 10,5 μJ (Figure 86). S'il est possible de différencier des courbes de PSL très monodispersé (seulement quelques nanomètres de variabilité par rapport à la taille moyenne), il sera plus délicat de différencier des courbes obtenues avec des nanoparticules ayant une dispersion plus large. En effet, la répétabilité des courbes sera amoindrie entraînant un possible chevauchement écart types de courbes obtenues avec des nanoparticules de tailles proches.

III.1.2.1 Effet du changement de fréquence laser

Dans les étapes précédentes il a été choisi de fixer la fréquence laser à 150 Hz. Il est cependant intéressant de savoir si le changement de fréquence du laser impacte l'allure des courbes en S (pour une énergie stable). Une dispersion de PSL standards de 100 ± 3 nm dispersés dans de

l'eau ultra pure dégazée à la concentration de 10^{10} part mL^{-1} est utilisée. Le débit du flux dans la cuvette de 4 ml h^{-1} n'est pas changé car il permet un renouvellement du volume focal entre deux impulsions laser, même à la plus forte fréquence laser.

Les courbes en S obtenues avec une fréquence de 50 et 150 Hz ont un seuil similaire égal à $7,2 \pm 0,5 \mu\text{J}$ tandis que la courbe obtenue à 200 Hz a un seuil de $8,1 \pm 0,5 \mu\text{J}$ (Figure 87). Du fait que les écarts types se chevauchent, il n'est pas possible d'affirmer qu'il y a une différence significative entre les seuils des trois courbes.

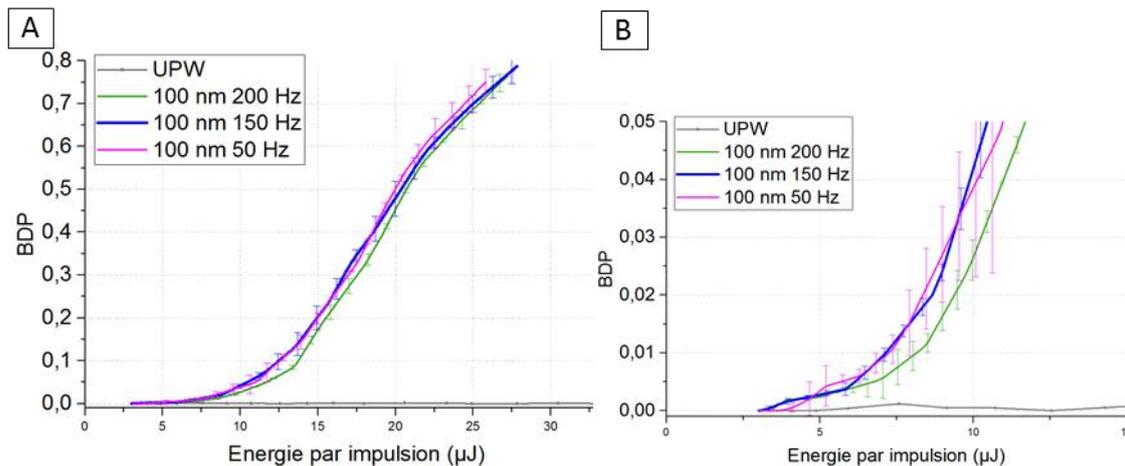


Figure 87: A : Comparaison de courbes en S de PSL 100 nm concentrées à 10^{10} part mL^{-1} obtenues en changeant les fréquences laser : 50, 150, 200 Hz. B: agrandissement au niveau du seuil des courbes en S. Moyennes \pm écart type.

L'augmentation de la fréquence laser a également un impact sur le temps de mesure du Magellan. Pour obtenir une courbe en S le logiciel fait 5 mesures d'énergie durant 500 tirs laser afin d'ajuster l'énergie du laser à l'énergie demandée. Puis le logiciel enregistre les événements de plasmas pendant 2000 tirs laser (en haute résolution) pour faire l'acquisition d'un point. Lorsque l'on passe de la fréquence de 100 à 150 Hz le temps de mesure d'un point passe de 20 à 13,33 secondes. En conséquence, la durée d'acquisition d'une courbe en S en haute résolution contenant 100 points passe de 75 à 50 min. Cette augmentation de fréquence est donc très bénéfique en gain de temps pour les mesures de très petites particules très petites particules (10 nm et moins) qui ont un seuil énergétique élevé, et/ou les dispersions très diluées en nanoparticules (10^3 - 10^6 part mL^{-1}) qui ont une pente faible.

En conclusion, le nouveau laser Flare Nx est plus efficace pour créer des plasmas sur les PSL que l'ancien laser, il est donc possible de détecter les nanoparticules à des énergies plus faibles qu'avant. Cela ne change pas la sensibilité de l'instrument, mais cela permet de réduire le temps de d'obtention d'une courbe en S complète, car les plasmas apparaissent plus tôt. La légère augmentation de la fréquence laser (50Hz) permet également de réduire le temps de mesure. Ceci est particulièrement intéressant pour les dispersions de très petites nanoparticules et/ou très diluées.

Pour une même taille de particule les seuils sont décalés vers les basses énergies, il sera donc plus délicat de mesurer des particules supérieures à 500 nm, et il faudra privilégier la mesure de petites particules dans la gamme 1-200 nm. Les seuils énergétiques sont plus rapprochés les uns des autres pour des particules de différentes tailles, il sera donc plus difficile de différencier

des dispersions de nanoparticules polydisperses et/ou de taille proche, surtout dans la gamme 100-200 nm.

III.2 Mesure de différents types de particules

Les milieux de dispersions peuvent impacter les charges de surface des nanoparticules et potentiellement induire une modification du seuil de création de plasmas. Dans la suite de cette partie seront étudié l'impact du changement de surface de PSL via un changement de pH ou l'adjonction de surfactants. Ensuite différents matériaux de nanoparticules seront comparés aux PSL de référence.

III.2.1 PSL dispersés avec des surfactants

Des PSL 100 ± 3 nm sont dispersés dans de l'eau ultra pure ou dans une solution de surfactant non ionique : le Triton X100 (TX100, Sigma Aldrich) pour obtenir une concentration particulaire de 10^{10} et 10^9 part ml^{-1} . Le TX100 est dilué afin d'obtenir une concentration équivalente à la concentration micellaire critique (CMC) soit 0,24 mM. La CMC est la concentration à partir de laquelle les molécules amphiphiles du Triton X100 forment des micelles dans l'eau comme illustré en **Figure 88**. Les courbes en S ont été obtenues avec le laser Flare 532.

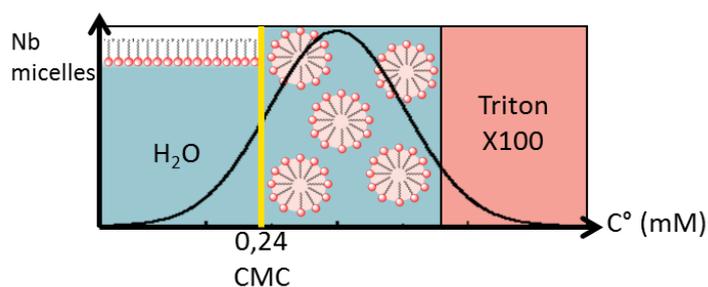


Figure 88 : Formation des micelles de triton X100 dans l'eau en fonction de la concentration en Triton X100.

La solution de TX100 sans nanoparticule à une courbe en S avec un seuil inférieur à celle de l'eau (Figure 89, Tableau 14). La pente de la courbe des TX100 est similaire à la pente des PSL à la concentration de 10^{10} part mL^{-1} . Cela indique que des plasmas sont créés sur des colloïdes en suspension dans la solution de TX100. Comme la solution est à la concentration micellaire critique, il y a formation de micelle à l'intérieur de la solution. Ce sont certainement ces micelles qui sont détectées par la LIBD.

Les seuils et les pentes des courbes des PSL à la concentration de 10^{10} part mL^{-1} est identique qu'ils soient dispersés dans l'eau ultra pure ou dans le TX100. De même, pour la dispersion concentrée à 10^9 part mL^{-1} . (Figure 89, Tableau 14).

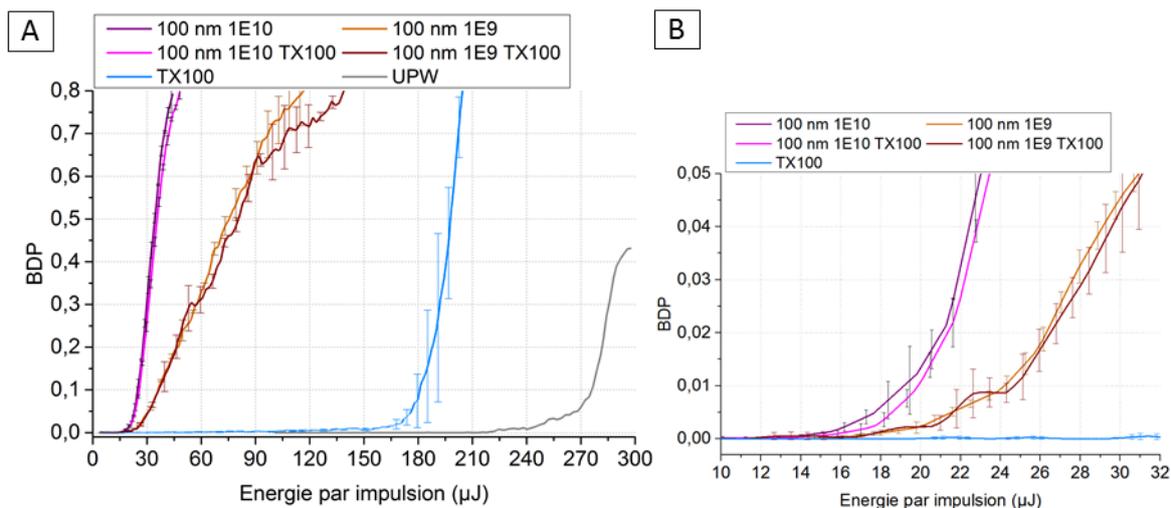


Figure 89 : A : Courbes S de PSL 100 nm aux concentrations de 10^{10} et 10^9 part mL^{-1} dispersées dans de l'eau ultra pure ou dans du triton X100 à la concentration micellaire critique. B : agrandissement de seuils des courbes en S des PSL. Moyennes \pm écarts types.

Tableau 14 : Comparaison de courbes en S de PSL 100nm dispersés dans de l'eau ultra pure ou du Triton X100.

	Eau ultra pure	TX100	PSL 100 nm 10^{10} part mL^{-1} dans UPW	PSL 100 nm 10^{10} part mL^{-1} dans TX100	PSL 100 nm 10^9 part mL^{-1} dans UPW	PSL 100 nm 10^9 part mL^{-1} dans TX100
Seuil	242 μ J	158,7 \pm 1,06 μ J	19,1 \pm 0,5 μ J	19,8 \pm 0,2 μ J	24,3 \pm 0.3 μ J	24,7 \pm 0,6 μ J
Pente		Pente similaire à celle des PSL 10^{10} part mL^{-1}	Pente similaire entre ces deux courbes		Pente similaire entre ces deux courbes	

La présence de surfactant dans la dispersion de PSL ne semble pas perturber la mesure en LIBD car les courbes obtenues sont similaires aux deux concentrations en particule mesurées. Fedotova et ses collaborateurs (Fedotova et al., 2015) ont étudié l'influence d'agents de dispersion dans des préparations de PSL (50 nm) sur la réponse de la LIBD. Leurs résultats montrent que la concentration (de 0,02 à 20 mM) en SDS ou en pyrophosphate de sodium a une influence sur la pente des courbes en S. Plus la concentration en surfactant augmente plus la pente des courbes en S augmente par rapport à la courbe de PSL de référence. Mais ce phénomène se produit uniquement quand la concentration particulière en PSL est faible ($2 \cdot 10^7$ part mL^{-1}). D'autre part, le seuil énergétique des courbes en S de PSL n'est pas influencé par la présence de pyrophosphate de sodium, mais diminue quand la concentration en SDS augmente. L'allure des courbes en S varie donc en fonction du type de surfactant, de la concentration en surfactant et de la concentration en nanoparticules. Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément ce phénomène en comparant plusieurs concentrations en surfactant et plusieurs concentrations en particules afin de savoir si l'on obtient le même comportement, que Fedotova et al., avec le triton X100 (Fedotova et al., 2015).

III.2.2 Influence du pH sur une mesure de courbe en S

La variation du pH d'une dispersion de nanoparticule peut changer la charge de surface des particules et donc la quantité d'électrons. Comme la création d'un plasma dépend de la formation d'une cascade d'électron, il est possible qu'un changement de pH induise une variation du seuil d'un même type de particule.

Une dispersion nanoparticule de référence est préparé en dispersant des PSL de 100 ± 3 nm à la concentration de 10^{11} part mL^{-1} dans de l'eau ultra pure dont le pH est de 7 et le potentiel zeta $\zeta = -32$. Puis d'autres dispersions de PSL sont préparées dans l'eau ultra pure additionnée de HCl concentré ou de NaOH concentré pour obtenir les valeurs de pH suivantes : pH = 3 ; 4 ; 5 ; 10 et 11. Les dispersions sont mesurées avec le Magellan (contenant le Flare NX) juste après leur préparation, avant une éventuelle agrégation, afin d'évaluer uniquement l'impact d'un changement de milieu.

Le seuil des PSL varie entre 11.6 et 13.2 μJ (**Figure 90, Tableau 15**) et ne semble pas évoluer en fonction du pH, en revanche il semble diminuer quand la charge ionique augmente.

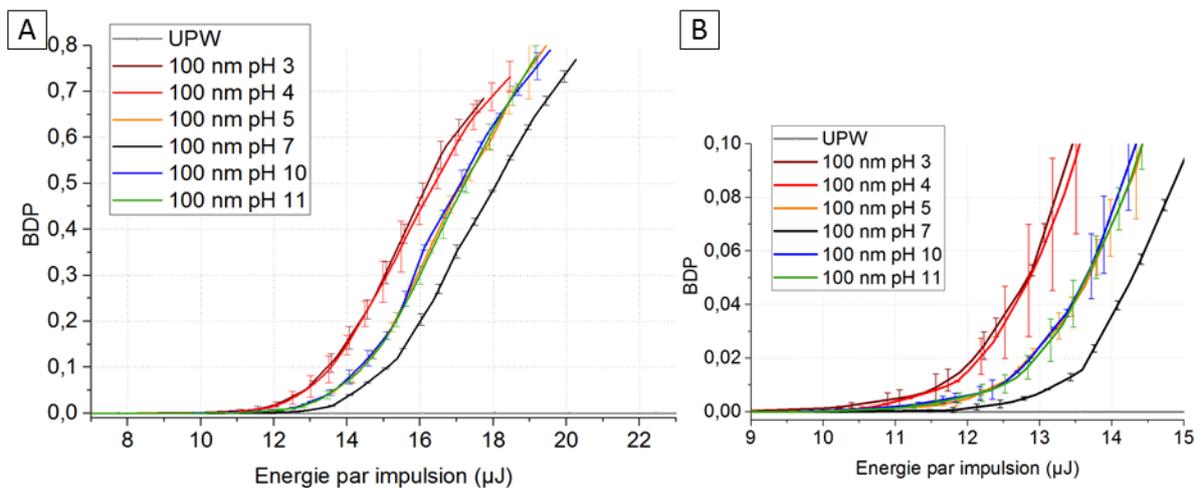


Figure 90 : A : Courbe en S de latex polystyrène 100 nm préparés à pH 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 10 et 11. B : Agrandissement au niveau du seuil des courbes en S. Moyenne \pm écart type.

Tableau 15 : comparaison des pentes et seuils de courbes en S obtenues avec des PSL de 100nm dispersés à différents pH

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7	pH 10	pH 11
Seuil	11,6 μJ	11,6 μJ	12,5 μJ	13,2 μJ	12,5 μJ	12,5 μJ
Pente	Similaire à tous les pH					

La pente de toutes les courbes est en revanche identique, indiquant une concentration particulière similaire. Le changement de seuil ne peut donc pas être attribué à une agrégation des nanoparticules. Ceci est confirmé par la mesure du diamètre hydrodynamique via la DLS qui indique une variation de seulement quelques nanomètres (106-118 nm), imputable au changement de force ionique dans la solution (**Figure 91**).

On peut conclure que le changement de pH influence les mesures LIBD et les courbes en S obtenues. Les résultats indiquent qu'il est plus facile de créer des plasmas sur les particules dispersées avec un pH différents de l'eau ultra pure. Initialement la dispersion mère de PSL contient des surfactants non ioniques tels que le sodium dodecyl sulfate (composition exacte en surfactant non communiquée par le fabricant). L'adjonction de soude ou d'acide chlorhydrique a dû augmenter la charge de surface des particules et la rendre plus négative. En conséquence, la quantité d'électron en surface a dû être augmentée ce qui pourrait expliquer la plus grande facilité à créer des plasmas sur ces particules.

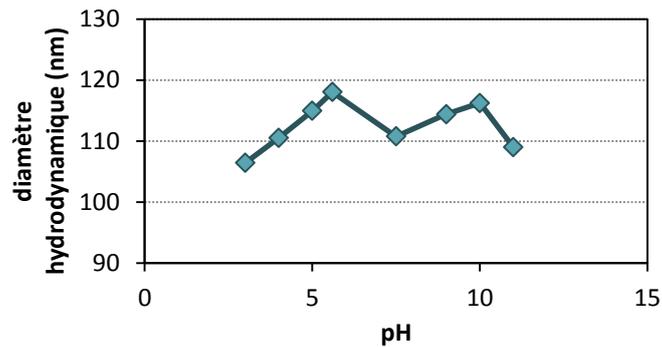


Figure 91: diamètre hydrodynamique de PSL 100nm en fonction du pH.

III.2.3 Nanoplastiques PS-ref

Pour compléter les résultats de la caractérisation des PS-ref, ces nanoplastiques de référence ont été mesurée avec la LIBD pour avoir plus d'informations sur la taille et la concentration moyenne en particules. La concentration étant précédemment établie en utilisant la mesure de carbone organique totale et la mesure de la distribution en taille était obtenue en utilisant la DLS (algorithme SBL, Vasco Flex, Cordouan Technologies).

Une dispersion de PS-ref à la concentration de 1 ppm dans de l'eau ultrapure a été comparée à des dispersions de PSL de 200 nm aux concentrations de $2 \cdot 10^8$ et $2 \cdot 10^9$ part ml^{-1} correspondant à des concentrations de 1 et 11 ppm respectivement, et également à une concentration de $1 \cdot 10^{10}$ part mL^{-1} . Les PS-ref ont aussi été comparés à des PSL de 500 nm de diamètre à la concentration de $4 \cdot 10^7$ part mL^{-1} . Les courbes en S obtenues sont représentées sur la **Figure 92**.

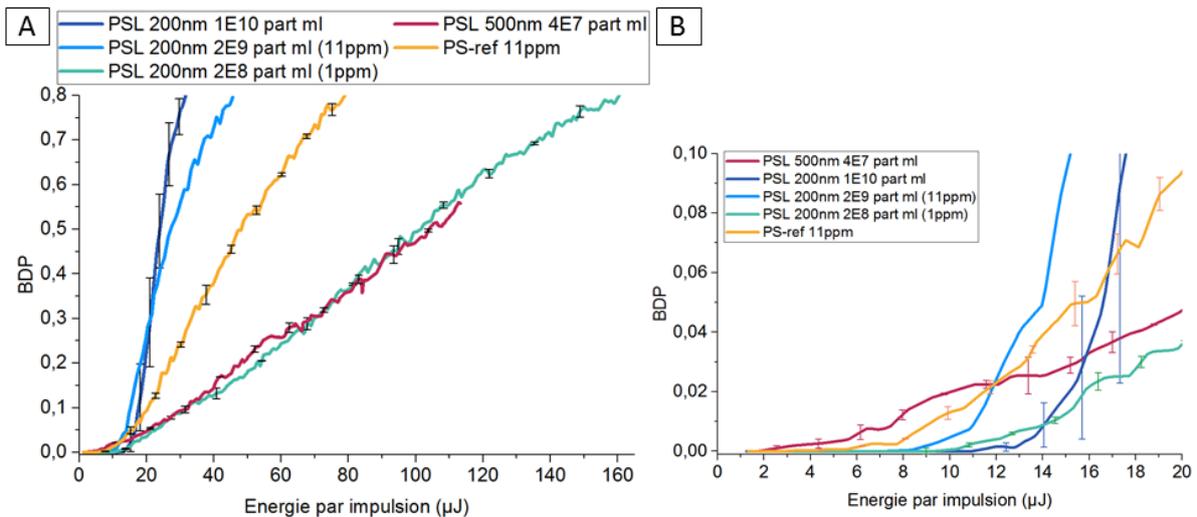


Figure 92: A : Comparaison de courbes en S de nanoparticules de PS-ref (11ppm), avec des PSL de 200nm aux concentrations de $2 \cdot 10^{10}$ part mL⁻¹ ; $2 \cdot 10^9$ part mL⁻¹ (11ppm) ; $2 \cdot 10^8$ part mL⁻¹ (1ppm); et des PSL de 500nm à la concentration de $4 \cdot 10^7$ part mL⁻¹. B : agrandissement au niveau des seuils des courbes en S. Moyennes \pm écart type.

Le seuil de la courbe en S des PS-ref est de 9,35 μ J, il est inférieur au seuil des PSL de 500 nm (7,7 μ J) et supérieur au seuil des PSL de 200 nm (11-14 μ J selon les concentrations) (**Figure 92B**). Cela montre que le diamètre moyen des PS-ref est compris entre 200 et 500 nm. Dans le cas d'échantillons polydispersés, la taille moyenne obtenue en LIBD représente la population des plus grosses particules de la dispersion. Cette valeur est donc cohérente avec la distribution en taille obtenue en DLS qui indique deux populations en taille : la première d'environ 150 nm et la deuxième entre 400 et 500 nm (voir la partie matériels et méthodes du chapitre 2). Les résultats DLS indiquent néanmoins que la population de 150 nm est majoritaire en nombre de particules. Or, lorsqu'on regarde la partie linéaire de la courbe en S, il n'y a qu'une seule pente (**Figure 92A**). Ce qui signifie que la population de petites particules n'est pas assez concentrée en nombre de particules, pour influencer la pente de la courbe en S qui est ici principalement gouvernée par la concentration des grosses nanoparticules.

La pente des PS-ref est inférieure à celle des PSL 200nm à $2 \cdot 10^9$ part mL⁻¹ mais supérieure à celles des PSL 200 nm à $2 \cdot 10^8$ part mL⁻¹ (**Figure 92A**). Cela signifie que la concentration particulaire moyenne des PS-ref est comprise entre ces deux valeurs. Si les PS-ref étaient composés de nanosphères monodispersées, d'après la concentration massique (11ppm) leur concentration particulaire serait de $3 \cdot 10^8$ part mL⁻¹ pour une population 400 nm, et de $6 \cdot 10^9$ part mL⁻¹ pour une population de 150 nm. La concentration moyenne obtenue avec la LIBD est en donc en accord avec les estimations théorique que nous avons calculé.

III.2.4 Nanoparticules de silice

Afin de comparer la réponse de la LIBD avec des nanoparticules de différents matériaux deux types de nanoparticules de silice sont mesurées avec le Magellan (contenant un Flare 532) et comparées avec des dispersions de PSL de 20 et 30 nm.

Le premier type de nanoparticule de silice est le Ludox CL (Sigma-Aldrich) avec un noyau composé de SiO₂ et une coque en hydroxyde d'aluminium. La surface des particules est chargée positivement et possède un contre ion chlorure. Les particules sont dispersées dans de l'eau

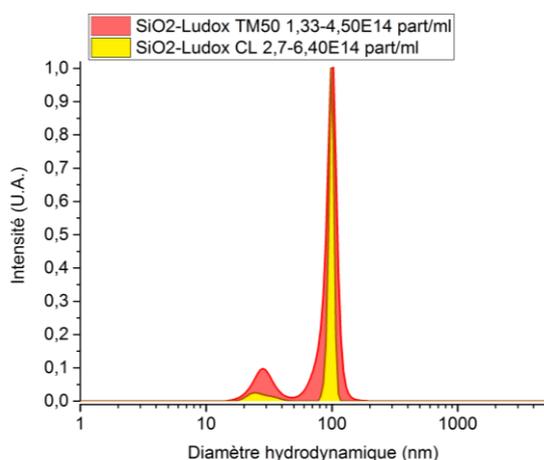
pure et le pH de la solution mère est de 4,5. Les nanoparticules mesurent majoritairement entre 15 et 20 nm (Mesure MET par le fabricant) et la concentration est de 30% massique. On peut donc en déduire que la concentration particulaire se situe entre $2,7.10^{16}$ et $6,40.10^{16}$ part mL⁻¹. Le deuxième type de particule de silice est le Ludox TM 50 (Sigma-Aldrich) qui sont composé de SiO₂ et n'ont pas de coque. Elles sont chargées négativement et ont un contre ion sodium. Les particules sont dispersées dans de l'eau pure et le pH de la solution mère est entre 8,5 et 9,5. Les nanoparticules mesurent majoritairement entre 20 et 30 nm (Mesure MET par le fabricant) et la concentration est de 50% massique. On peut donc en déduire que la concentration particulaire se situe entre $1,33.10^{16}$ et $4,50.10^{16}$ part mL⁻¹. Les deux types de Ludox sont diluées par 100 dans de l'eau ultra pure. Les caractéristiques des deux Ludox sont résumées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Résumé des caractéristiques des dispersions de nanoparticules de silice Ludox CL et Ludox TM 50.

	Composition	Charge de surface	pH	Taille (nm)	Concentration massique (% m)	Concentration particulaire initiale (part mL ⁻¹)
Ludox CL	SiO ₂ , coque en Al(OH) ₃ .	Positive	4,5	15-20 nm + agrégats	30 %	$2,7.10^{16}$ - $6,40.10^{16}$
Ludox TM 50	SiO ₂	Négative	8,5-9,5	20-30 nm + agrégats	50 %	$1,33.10^{16}$ - $4,50.10^{16}$

Les nanoparticules de silices sont comparées à des PSL de 20 nm aux concentrations de $2,27.10^9$ à 10^{11} part mL⁻¹ et des PSL de 30 nm aux concentrations de $6,74.10^8$ à 10^{11} part mL⁻¹.

La distribution en taille des Ludox est mesurée avec la DLS *in situ* (Vasco Flex, Cordouan Technologies). Les deux Ludox ont des tailles de nanoparticules similaires, avec une première population autour de 26 nm (28,2 nm pour les Ludox TM50 et 24,5 nm pour les Ludox CL) et une deuxième population autour de 98,2 nm (**Figure 93**). Si l'on considère uniquement la population de petites particules, les Ludox CL ont rayon hydrodynamique supérieur à la taille nominale indiquée par le fabricant, et les Ludox TM 50 ont contraire un rayon hydrodynamique inférieur à la taille nominale (**Tableau 16**). La deuxième population de particule correspondrait aux agrégats contenus dans les deux Ludox selon le fabricant.



	Mode (nm)	Intensité (%)	SD (%)
TM 50 Pic 1	28,2	15	22,1
TM 50 Pic 2	98,2	85	15
CL Pic 1	24,5	9,4	21,9
CL Pic 2	98,2	90,6	6,5

Figure 93 : Distribution en taille de nanoparticules de silice Ludox CL et Ludox TM 50 dilués par 100. Diagramme obtenu avec la DLS et l’algorithme SBL puis normalisé en intensité.

Lorsque l’on mesure les Ludox avec la LIBD (**Figure 94**), on obtient des courbes en S qui ont des caractéristiques proches. Les seuils et les pentes obtenues pour les nanoparticules de silice est résumé dans le **Tableau 17**.

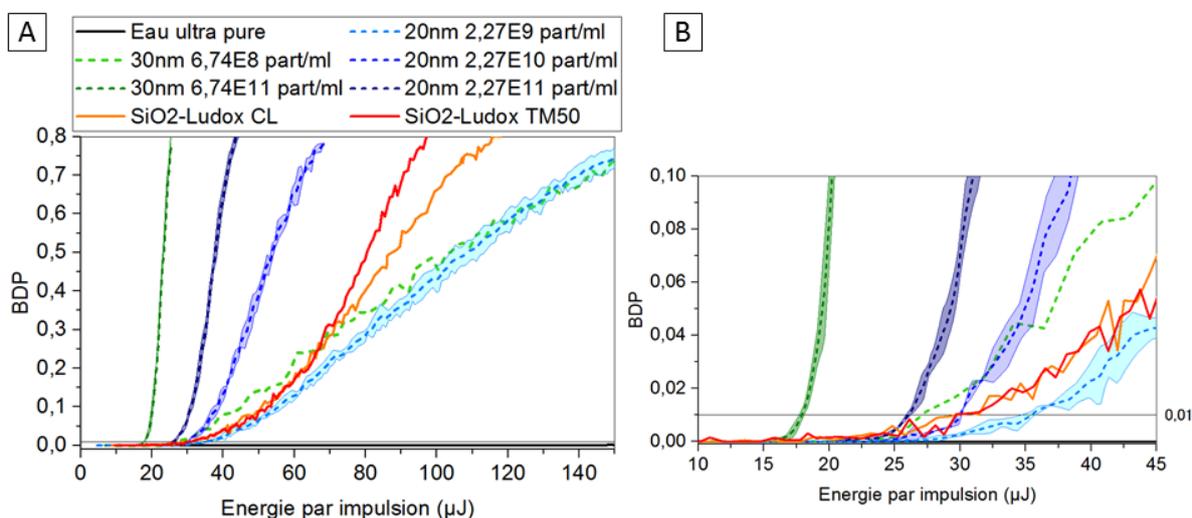


Figure 94: A : Comparaison de courbes en S de nanoparticules de silice Ludox TM50 et Ludox CL diluées par 100, avec des PSL de 20 et 30 nm. B : agrandissement au niveau des seuils des courbes en S. Moyenne \pm écart type.

Tableau 17 : seuils et pentes de courbes en S obtenues avec des nanoparticules de silices et des PSL de 30 et 20 nm

	Seuil	Pente
Ludox CL	30,9 μJ	0,012 μJ^{-1}
Ludox TM 50	31,3 μJ	0,018 μJ^{-1}
PSL 30 nm 6.74.10 ¹¹ part mL ⁻¹	17,9 \pm 0.2 μJ	0.151 μJ^{-1}
PSL 20nm 2,27.10 ¹⁰ part mL ⁻¹	30,2 \pm 0,1 μJ	0,027 μJ^{-1}
PSL 20nm 2,27.10 ⁹ part mL ⁻¹	35 \pm 0.5 μJ	0.007 μJ^{-1}

Si l’on compare les courbes en S des Ludox avec des courbes en S de PSL de référence qui ont des caractéristiques similaires, on remarque que les Ludox ont un seuil plus proche des PSL de 20 nm (10¹⁰ part mL⁻¹) que des PSL de 30 nm (10¹¹ part mL⁻¹). La pente des deux Ludox est légèrement inférieure à celle des PSL de 20 nm à 2,27.10¹⁰ part mL⁻¹ (**Figure 94, Tableau 17**). D’après ces résultats, on peut conclure que les deux Ludox comportent une majorité de particules de taille moyenne proche de 20 nm avec une concentration comprise entre 2,27.10⁹ et 2,27.10¹⁰ part mL⁻¹. La taille moyenne des particules obtenue par la LIBD est en accord avec les données du fabricant et les résultats DLS. Cependant, les deux types de Ludox ont des tailles et des charges de surface différentes si l’on se réfère aux données du fabricant et les résultats de DLS, et en théorie on devrait observer une différence de seuil énergétique. Mais ici,

les courbes en S sont trop bruitées et trop proches l'une de l'autre pour pouvoir affirmer qu'il y ait une réelle différence entre leurs seuils énergétiques. Concernant la concentration particulaire, cette dernière n'est pas en accord avec la concentration théorique qui doit être de l'ordre de 10^{14} part mL⁻¹. La pente des courbes en S aurait dû être supérieure ou égale à celle de PSL concentrée à 10^{11} part mL⁻¹. Néanmoins, on retrouve un rapport cohérent entre les deux courbes, car les Ludox TM 50 ont une pente (et donc une concentration) supérieure à celle des Ludox CL.

D'après les résultats de Walther (Kim and Walther, 2007; Yun, 2007), les nanoparticules de silice sont transparentes à la longueur d'onde du laser qui émet dans le vert, et il devrait être plus difficile de créer des plasmas à leur surface. En effet, théoriquement les PSL ont une énergie d'ionisation de 7,8 eV, ce qui implique l'absorption de 4 photons pour être ionisé et initier la formation d'un plasma (532 nm, $h\nu = 2,3$ eV). Or, l'énergie d'ionisation de la silice est de 11,7 eV, il y a donc besoin de plus d'énergie pour créer un plasma, en l'occurrence 6 photons. L'équipe de Yun (Yun, 2007) obtient des courbes en S de nanoparticules de silice avec un seuil énergétique 2 fois plus élevé que pour des PSL de taille similaire (100 nm et 400 nm). De même, l'équipe de Fedotova (Fedotova, 2015), obtient un seuil énergétique 3,3 fois plus élevé (100 nm).

Les résultats obtenus ici avec les Ludox sont donc particuliers, car leurs seuils énergétiques sont similaires à ceux de PSL de même diamètre. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Premièrement les Ludox seraient des particules de silice particulières qui auraient un potentiel d'ionisation différent de nanoparticules de SiO₂ utilisées dans la littérature. Deuxièmement, la concentration très élevée en nanoparticule (10^{14} part mL⁻¹) aurait augmenté la probabilité de créer des plasmas à faible énergie et aurait décalé le seuil de la courbe en S vers les basses énergies. Ce comportement est observable pour les PSL de 30 nm qui ont un seuil de $17,9 \pm 0,2$ μ J à la concentration de pour les courbes de 10^{11} part mL⁻¹ et un seuil de $27,2 \pm 0,1$ μ J à la concentration de 10^8 part mL⁻¹ (**Figure 94**).

III.2.5 Nanoparticules d'argent

Afin d'évaluer la différence de réponse en LIBD entre des matériaux métalliques et des matériaux plastiques, des nanoparticules d'argent ont été mesurées en comparaison avec des PSL.

Les nanoparticules d'argent utilisées sont des particules de références de la série NM-300 servant pour le programme OECD. Leur taille est inférieure à 20 nm et les dispersions contiennent les surfactants suivants : Polyoxyéthylène Glycérol Trioleate, Polyoxyéthylène, et du Sorbitan mono-Laurat (Tween 20) à la concentration de 4 % massique pour chaque produit. La mesure des classes de tailles a été réalisée en microscopie électronique à transmission par le JRC (Klein et al., 2011), et sont résumées dans le **Tableau 18**. En utilisant la concentration massique ($9,7 \pm 0,4$ % massique) et la densité des particules ($1,10$ kg L⁻¹), on peut calculer la concentration particulaire (cf **Tableau 18**).

Tableau 18: caractéristiques des nanoparticules d'argent NM 300

Tailles selon le JRC	5.42± 2 nm	15.03± 2 nm	15-20nm	>20nm	
% de la classe de taille(JRC)	26 %	46%	27%	1%	
Concentration particulaire de la dispersion mère	3,5.10 ¹⁸ part mL ⁻¹	2,29x10 ¹⁷ part mL ⁻¹			
Tailles obtenues en DLS	5.6 nm		28.2 nm	93.7 nm	786.3 nm

La distribution en taille des nanoparticules d'argent est évaluée grâce à la DLS *in situ* (Vasco Flex, Cordouan Technologies), et quatre populations sont mesurées à partir de l'intensité diffusée dont les modes sont 5,6 ; 28,2 ; 93,7 et 786,3 nm (**Figure 95**).

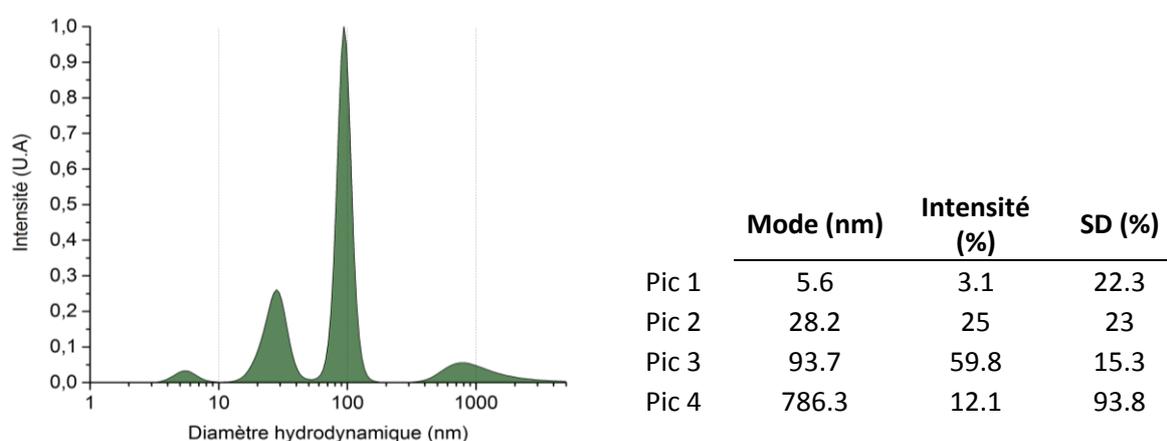


Figure 95 : Distribution en taille de nanoparticules d'argent dilués 45 000 fois. Diagramme obtenue avec la DLS et l'algorithme SBL puis normalisé.

Sachant que l'intensité diffusée d'une particule homogène et sphérique est proportionnelle à son rayon à la puissance 6, on peut conclure que la population de 5,6 nm est présente en quantité non négligeable. Selon le même raisonnement, la faible intensité de la population de 786 nm démontre une concentration plutôt faible par rapport aux autres populations. Les populations de 5,6 ; 28 et 93,7 nm sont en accord avec les données du JRC sur les NM300. La population de 786 nm représente probablement des impuretés ou quelques inhomogénéités dans la dispersion qui sont détectées plus facilement en DLS quand la solution est diluée.

Les nanoparticules d'argent sont diluées 45 000 fois dans de l'eau ultra pure pour les mesures LIBD. Ce qui donne des concentrations de 8.10¹³ part mL⁻¹ pour les particules aux alentours de 5 nm et 5,4.10¹² part mL⁻¹ pour les particules autour de 15 nm. Les PSL utilisés comme référence sont des PSL de 20 nm aux concentrations de 2,27.10⁸ et 2,27.10¹⁰ part mL⁻¹.

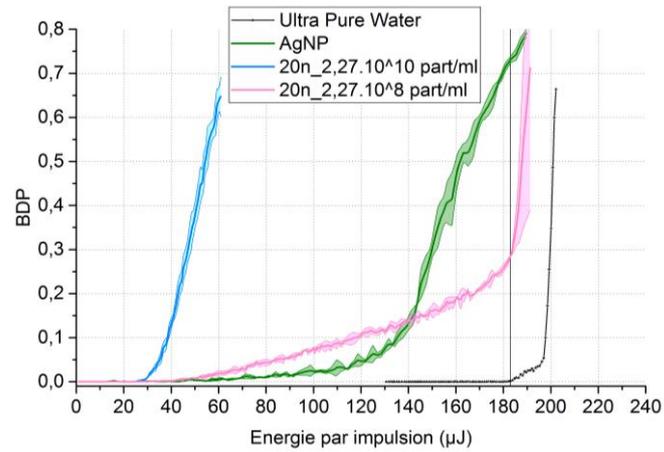


Figure 96 : Comparaison des courbes en S de nanoparticules d'argent avec des PSL de 20 nm. Moyennes \pm écart type.

La courbe en S des nanoparticules d'argent obtenue en LIBD avec un Flare NX (**Figure 96**) a un seuil de 78,4 μJ et possède deux pentes. La première pente est de $3,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{J}^{-1}$ entre 60 et 110 μJ , et la deuxième pente est de $0,016 \mu\text{J}^{-1}$ entre 140 et 170 μJ . La première partie de la courbe des NM300 se rapproche de la courbe en S des PSL 20 nm à la concentration de $2,27 \cdot 10^8 \text{ part mL}^{-1}$ qui a un seuil est de 51,8 μJ et une pente de $0,002 \mu\text{J}^{-1}$. La deuxième partie de la courbe des NM300 a une pente plutôt proche des PSL à la concentration de $2,27 \cdot 10^{10} \text{ part mL}^{-1}$ qui est de $0,026 \mu\text{J}^{-1}$. Si l'on prolonge la deuxième partie de la courbe jusqu'à l'axe des abscisses on peut déterminer un seuil énergétique de 133,7 μJ .

La dispersion des nanoparticules d'argent est donc composée d'au moins deux populations de taille. La première est proche de 20 nm à une concentration inférieure à $2,27 \cdot 10^8 \text{ part mL}^{-1}$ et la deuxième population a une taille très inférieure à 20 nm pour une concentration proche de $2,27 \cdot 10^{10} \text{ part mL}^{-1}$. D'après la distribution en taille obtenue en DLS, il est probable que la deuxième partie de la courbe en S corresponde à des nanoparticules proches de 5 nm. Les résultats en taille sont cohérents avec les tailles indiquées par le rapport du JRC. En revanche, les courbes en S ne permettent pas de mettre en évidence les populations de 93 et 786 nm.

Les concentrations particulières des NM300 obtenues avec la LIBD ne sont pas cohérentes avec les concentrations données par le rapport du JRC et sont inférieure aux valeurs théoriques d'un facteur 10^3 à 10^5 . Le rapport du JRC mentionne que les dispersions de nanoparticules d'argent ne sont pas stables lorsqu'elles sont diluées, et 0,01 % massique de l'argent solide se dissous en argent ionique. Dans notre cas, cela correspondrait à une diminution de $0,01 \text{ part mL}^{-1}$ sur la concentration particulière, et ça ne suffit pas à expliquer la faible valeur de pente.

En théorie, le potentiel d'ionisation des nanoparticules d'argent est de 4,05 à 4,39 eV (Sun and Barnard, 2017) et il est bien inférieure à celui des nanoparticules de polystyrène qui est de 7,8 eV (Jung and Cho, 2008; Yun, 2007). En théorie il devrait donc être plus facile de créer des plasmas sur des nanoparticules d'argent, mais nos résultats montrent des seuils énergétiques équivalents pour des nanoparticules d'argent et des PSL de taille similaire. Au contraire, l'équipe de Fedotova (Fedotova, 2015) montre que l'énergie requise pour créer des plasmas sur des nanoparticules d'argent de 20 à 100 nm est plus importantes que pour faire claquer des PSL de taille équivalente.

Il faudrait faire plus de mesure de ces nanoparticules d'argent avec des concentrations différentes, afin de vérifier ces résultats préliminaires et de comprendre l'allure des courbes en S obtenues.

III.2.6 Nanoparticules de fullerènes nC60

Les nanoparticules de Fullerènes nC60 n'ont encore jamais été mesurées en LIBD. Il est pourtant très intéressant de comparer le comportement de différentes particules carbonées dont la structure des molécules est différente, comme les fullerènes et les PSL.

Les suspensions de nanoparticules de fullerène nC60 sont obtenues par dispersion de la poudre de fullerène dans une solution de triton X100 (Sigma Aldrich) à la concentration de 0.72 mM soit 3 fois la CMC, puis agitée pendant 24 heures. La solution est ensuite filtrée sur un filtre seringue de 0,2 μm de pore, puis mesurée avec la DLS (Vasco Flex, Cordouan Technologies) et avec le Magellan (contenant un Flare Nx (après réparation)).

Les résultats DLS montre que la dispersion de fullerène est principalement composée de nanoparticules autour de 163 nm avec quelques inhomogénéités entre 600 et 2000 nm (Figure 97).

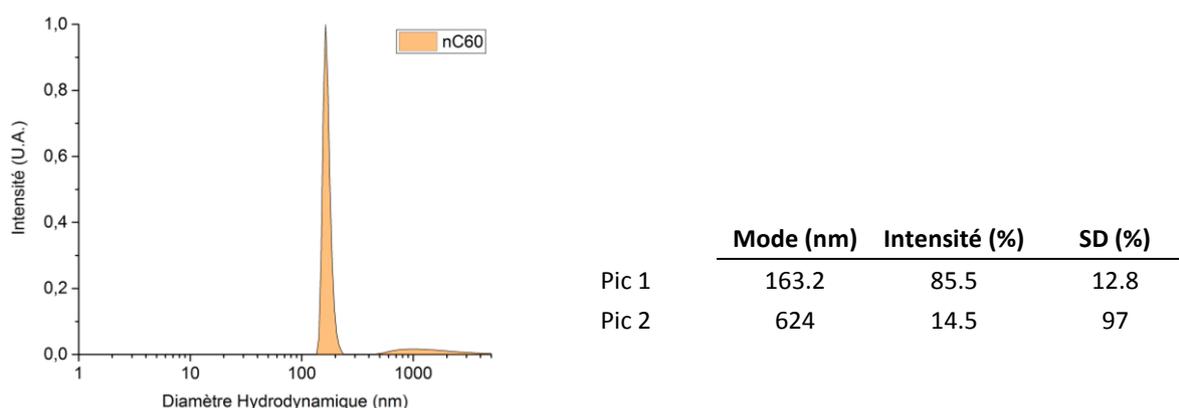


Figure 97 : Distribution en taille de nanoparticules de fullerène nC60 dispersées dans du triton X100. Diagramme obtenue avec la DLS et l'algorithme SBL puis normalisé.

Les mesures des fullerènes sont comparées avec des PSL 100 ± 3 nm dispersés dans de l'eau ultra pure aux concentrations de $1,82 \cdot 10^7$ et $1,82 \cdot 10^6$ part mL^{-1} .

Les résultats LIBD de la dispersion de fullerènes montrent une courbe en S avec un seuil de $115,6 \pm 1$ μJ et une pente de $4,03 \cdot 10^{-4}$ μJ^{-1} (Figure 98). Sa pente se situe entre celles des PSL 100 nm de $1,82 \cdot 10^7$ part mL^{-1} et celle des PSL 100 nm de $1,82 \cdot 10^6$ part mL^{-1} (Figure 98, Tableau 19).

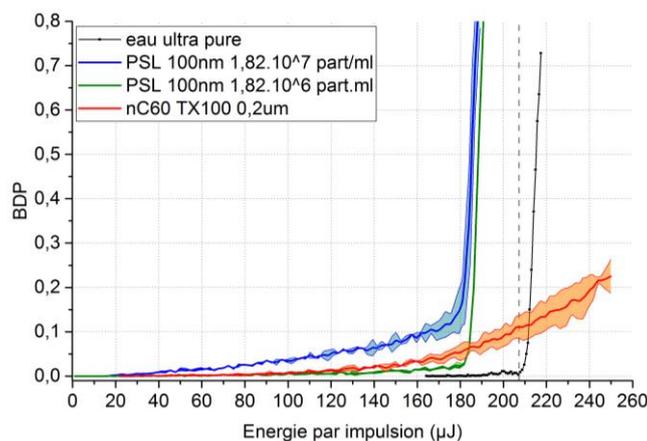


Figure 98 : comparaison de courbes en S de fullerènes nC60 dispersés dans du triton X100 avec des PSL 100 nm dispersés dans de l'eau ultra pure. Moyenne \pm écart type.

Tableau 19 : Seuils et pentes des courbes en S obtenues avec une dispersions de fullerene, et des PSL 100 nm

	seuil	Pente
nC60	115,6 \pm 1 μ J	4,03.10-4 μ J ⁻¹
PSL 100 nm 1,82.10 ⁷ part mL ⁻¹	43.47 \pm 0.1 μ J	6,17.10-4 μ J ⁻¹
PSL 100 nm 1,82.10 ⁶ part mL ⁻¹	144 \pm 1 μ J	2,44.10-4 μ J ⁻¹

On peut donc conclure que la concentration particulière en fullerène est entre $1,82.10^7$ et $1,82.10^6$ part mL⁻¹. La pente de la courbe en S des fullerènes étant assez faible, il est difficile d'estimer une taille de particule à partir du seuil. Néanmoins, son seuil énergétique est proche de celui des PSL de concentration $1,82.10^6$ part mL⁻¹ qui est de 144 ± 1 μ J, et cela semble cohérent avec la taille de 163 nm mesurée par la DLS.

Il serait intéressant de mesurer des dispersions de fullerène avec des concentrations en particule plus importante, afin de pouvoir mieux déterminer la taille et la concentration en particule. Il sera alors possible de déterminer s'il y a une différence de seuil énergétique pour créer des plasmas, par rapport à des nanoparticules de polystyrène de même taille.

Les résultats ont montré que disperser des PSL dans du triton X100 ne perturbe pas l'acquisition de courbe en S. Il a également été possible de détecter les micelles du triton X100. Le changement de pH des dispersions de PSL par rapport au pH de l'eau ultra pure décale le seuil énergétique vers des énergies plus faible et rend la création de plasma plus facile. Les nanoparticules de Silice ont des courbes en S avec des seuils similaires à ceux de PSL de taille équivalente. Cependant la concentration obtenue via la LIBD est très inférieure à la concentration donnée par le constructeur. Il serait judicieux de vérifier la concentration en particule par microscopie électronique, ou avec un NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). Il a également été possible de détecter et de différencier les deux plus petites populations de taille des nanoparticules d'argent avec la LIBD. Les tailles mesurées étaient cohérentes avec les tailles obtenues en DLS. Cependant, la concentration mesurée était très inférieure aux concentrations théoriques. Enfin, des nanoparticules de fullerènes nC60 ont pu être mesurées

en LIBD. Bien que leur concentration soit faible, la taille mesurée avec le Magellan est cohérente avec le diamètre hydrodynamique obtenue avec la DLS.

IV Conclusion

Dans cette étude nous avons montré que les caractéristiques du laser influencent le seuil énergétique de création de plasma sur les nanoparticules en suspension. Il est donc important de bien connaître les caractéristiques du laser de l'instrument, et de faire une calibration complète chaque fois qu'une modification de l'instrument peut modifier le faisceau laser (changement du laser, changement ou déplacement des éléments optiques tels que les lentilles).

Les acquisitions de courbes en S avec le Magellan montrent qu'il est possible de faire des mesures de taille et de concentration de particules qui sont de taille nanométrique, à très faible concentration, peu importe le matériau même pour des particules transparentes, et ce dans des milieux différents. Les mesures de tailles, obtenues à partir des seuils des courbes en S, montraient des valeurs en accord avec les mesures DLS. Cependant, les estimations étaient réalisées par encadrement avec des courbes en S de PSL, de taille et de concentrations parfois éloignées des dispersions d'intérêt. Il serait judicieux d'améliorer la précision des mesures de taille, en établissant des courbes de calibration à partir de PSL de taille et de concentration connue. De cette façon, il serait possible de déterminer précisément si le matériau des particules a une influence sur la création des plasmas et donc sur le seuil des courbes en S. Les concentrations estimées par les mesures LIBD n'ont pas toujours été en accord avec les valeurs théoriques ou données par le constructeur. De ce fait, il faudrait vérifier la concentration en particule par microscopie électronique, ou avec un NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). La qualification d'échantillons polydispersés est limitée et donne des informations moins précises que la DLS, le NTA ou la microscopie électronique, mais reste néanmoins possible comme nous l'avons vu avec les nanoparticules d'argent.

La LIBD est une technologie prometteuse qui permet d'avoir des informations sur des particules dans la gamme basse du nanomètre à des concentrations très faible de l'ordre de 10^4 à 10^{12} part mL^{-1} , là où d'autres technologies auraient atteint leurs limites de détection (DLS, NTA, A4F-SLS, microscopie optique...), ou perturberai la stabilité de l'échantillon (microscopie électronique). Le développement de protocole pour mesurer les nanoparticules dans les échantillons aquatiques environnementaux serait vraiment un plus, face au peu de technologies disponibles sur le marché actuellement pour mesure des traces des nanoparticules.

V Bibliographie

- Baik, M.H., Yun, J.I., Bouby, M., Hahn, P.S., Kim, J.I., 2007. Characterization of aquatic groundwater colloids by a laser-induced breakdown detection and ICP-MS combined with an asymmetric flow field-flow fractionation. *Korean J. Chem. Eng.* 24, 723–729. <https://doi.org/10.1007/s11814-007-0033-7>
- Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environ. Pollut.* 220, 540–548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>
- Bitea, C., Müller, R., Neck, V., Walther, C., Kim, J.I., 2003. Study of the generation and stability of thorium(IV) colloids by LIBD combined with ultrafiltration. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00559-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00559-9)
- Bitea, Claudia, Walther, C., Il, J., Geckeis, H., Rabung, T., Scherbaum, F.J., Cacuci, D.G., 2003. Time resolved observation of ZrO₂-colloid agglomeration. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 215, 55–66.
- Bolz, M., Hoffmann, W., Rühle, W., Becker, F., 1996. Characterization of Colloids in Primary Coolant, in: *Water Chemistry of Nuclear Reactor Systems 7*. pp. 1: 42-46. <https://doi.org/10.1680/wconrs7v1.25653.0007>
- Bouby, M., Ngo Manh, T., Geckeis, H., Scherbaum, F., Kim, J.I., 2002. Characterization of aquatic colloids by a combination of LIBD and ICP-MS following the size fractionation. *Radiochim. Acta* 90, 727–732. https://doi.org/10.1524/ract.2002.90.9-11_2002.727
- Brech, F., & Cross, L., 1962. Optical microemission stimulated by a ruby laser. *Appl. Spectrosc* 16, 59.
- Bundschuh, T., Wagner, T., Eberhagen, I., Hamsch, B., Koster, R., 2005. Detection of biocolloids in aquatic media by Nano-Particle Analyzer. *Spectroscopy* 19, 69–78.
- Bundschuh, T., Winzenbacher, R., Knopp, R., Kim, J., Köster, R., 2001. Quantification of aquatic nano particles after different steps of bodensee water purification with laser-induced breakdown detection (LIBD). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 29, 7–15. [https://doi.org/10.1002/1521-401X\(200107\)29:1<7::AID-AHEH7>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-401X(200107)29:1<7::AID-AHEH7>3.0.CO;2-I)
- Delos, A., Walther, C., Schäfer, T., Büchner, S., 2008. Size dispersion and colloid mediated radionuclide transport in a synthetic porous media. *J. Colloid Interface Sci.* 324, 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.017>
- Fedotova, N., 2015. Fundamental and applied studies of nanoparticle detection using laser-induced breakdown detection (LIBD). PhD thesis. ETH Zürich. <https://doi.org/10.3929/ethz-a-010464271>
- Fedotova, N., Kaegi, R., Koch, J., Günther, D., 2015. Influence of dispersion agents on particle size and concentration determined by laser-induced breakdown detection. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 103–104, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.12.002>
- Fujimori, H., Matsui, T., Ajiro, T., Yokose, K., Hsueh, Y.M., Izumi, S., Hsueh, Y.M., 1992. Detection of Fine Particles in Liquids by Laser Breakdown Method. *Jpn. J. Appl. Phys.* 31, 1514–1518. <https://doi.org/10.1143/JJAP.31.1514>
- Izumida, S., Onishi, K., Saito, M., 1998. Estimation of laser-induced breakdown threshold of microparticles in water. *Jpn. J. Appl. Phys.* 37, 2039.
- Jung, E.C., Cho, H.R., 2008. Characteristics of the Laser-Induced Breakdown Detection of Colloidal Nanoparticles for Determining Particle Size.
- Kim, H., Choi, S., Jung, E.C., Cho, H., Yun, J., Cha, W., 2018. TRLFS study of hydrolyzed Eu (III) species. *J. Lumin.* 202, 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.06.003>
- Kim, J.-I., Stumpe, R., Klenze, R., 1990. Laser-induced photoacoustic spectroscopy for the speciation of transuranic elements in natural aquatic systems, in: Yoshihara, K. (Ed.), *Chemical Applications of Nuclear Probes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 129–179. https://doi.org/10.1007/3-540-52423-1_5
- Kim, J.-I., Walther, C., 2007. Laser-Induced Breakdown Detection, in: *Environmental Colloids and Particles*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 555–612. <https://doi.org/10.1002/9780470024539.ch12>
- Kitamori, T., Yokose, K., Sakagami, M., Sawada, T., 1989. Detection and Counting of Ultrafine Particles in Ultrapure Water Using Laser Breakdown Acoustic Method. *Jpn. J. Appl. Phys.* 28, 1195.
- Klein, C.L., Comero, S., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T.A.J., Doren, E. Van, De, P.-J., Mast, T.J., Wick, P., Krug, H., Locoro, G., Hund-Rinke, K., Kördel, W., Friedrichs, S., Maier, G., Werner, J., Gawlik, B.M., 2011. NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. <https://doi.org/10.2788/23079>
- Lenz, R., Enders, K., Nielsen, T.G., 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, E4121–E4122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606615113>
- Plaschke, M., Schafer, T., Bundschuh, T., Manh, T.N., Knopp, R., Geckeis, H., Kim, J.I., 2001. Size Characterization of Bentonite Colloids by Different Methods. *Anal. Chem.* 73, 4338–4347. <https://doi.org/10.1021/ac010116t>
- Putri, K.Y., Adawiah, R., 2018. Detection of colloidal silver chloride near solubility limit. *J. Phys. Conf. Ser.* 985. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/985/1/012006>
- Radziemski, L.J., Cremers, D.A., 1989. *Laser-induced plasmas and applications*. M. Dekker.
- Rothe, J., Walther, C., Brendebach, B., Büchner, S., Fuss, M., Denecke, M.A., 2009. A combined XAFS , ESI TOF-MS and LIBD study on the formation of polynuclear Zr (IV), Th (IV) and Pu (IV) species 190, 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/190/1/012188>
- Scherbaum, F.J., Knopp, R., Kim, J.I., 1996. Counting of particles in aqueous solutions by laser-induced photoacoustic breakdown detection. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 63, 299–306. <https://doi.org/10.1007/s003400050087>
- Stoll, M., Huber, F.M., Schill, E., Schäfer, T., 2017. Parallel-plate fracture transport experiments of nanoparticulate illite in the ultra-trace concentration range investigated by Laser-Induced Breakdown Detection (LIBD). *Colloids Surfaces A* 529, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.067>
- Sun, B., Barnard, A.S., 2017. The impact of size and shape distributions on the electron charge transfer properties of silver nanoparticles. *Nanoscale* 9, 12698–12708. <https://doi.org/10.1039/c7nr03472e>
- Thang, N.M., Knopp, R., Geckeis, H., Kim, J.I., Beck, H.P., 2000. Detection of nanocolloids with flow-field flow fractionation and laser- induced breakdown detection. *Anal. Chem.* 72, 1–5. <https://doi.org/10.1021/ac991016e>
- Troester, M., Lipp, P., Sacher, F., Brauch, H., Hofmann, T., 2014. Laser-Induced Breakdown-Detection for reliable online monitoring of membrane integrity. *J. Memb. Sci.* 466, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.05.007>
- Wagner, T., Bundschuh, T., Schick, R., Schwartz, T., Koster, R., 2003. Investigation of colloidal water content with laser-induced breakdown detection during drinking water purification. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30, 266–274. <https://doi.org/10.1002/aheh.200390008>
- Wagner, T.U., Bundschuh, T., Köster, R., 2005. Laser-induced Breakdown Detection (LIBD) for the highly sensitive quantification of aquatic colloids. Part II: Experimental Setup of LIBD and Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* 22, 172–180. <https://doi.org/10.1002/ppsc.200500908>
- Walther, C., 2003. Comparison of colloid investigations by single particle analytical techniques * a case study on thorium-oxyhydroxides. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 81–92. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00562-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00562-9)
- Walther, C., Bitea, C., Hauser, W., Kim, J.I., Scherbaum, F.J., 2002. Laser induced breakdown detection for the assessment of colloid mediated radionuclide migration 195, 374–388.
- Yun, J. Il, 2007. Material Dependence of LIBD of Colloidal Particles in Water.pdf. *J. Opt. Soc. Korea* 11, 34–39.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les plastiques devenus essentiels pour les sociétés industrialisées s'accumulent dans les eaux de surfaces tout en se dégradant pour former des nanoplastiques. Les particules de taille nanométriques sont particulièrement dangereuses car elles peuvent traverser les membranes biologiques et être vectrices d'additifs toxiques ou polluants adsorbés à leur surface. Face au risque que représentent les nanoplastiques pour les écosystèmes et *in fine* pour l'Homme, il est important de pouvoir caractériser ces nanoparticules dans l'environnement et de comprendre leur comportement. Cela permettrait de déterminer leur transport, leur devenir, leur biodisponibilité et leur (éco)toxicité. Cependant c'est un véritable challenge technique d'étudier les nanoparticules de plastique car les techniques analytiques adaptées sont limitées. La littérature disponible sur le comportement et la toxicité des nanoparticules de plastique se concentre essentiellement sur des nanosphères de polystyrènes et utilisant des concentrations nettement plus élevées de ce qui pourrait être dans le milieu naturel. Or, ces particules ne sont pas représentatives des nanoparticules de plastique environnementales. D'autre part, les études utilisent des milieux de force ionique fixe, alors que l'environnement aquatique est composé d'une succession de systèmes de forces ioniques différentes et de gradients de salinité. C'est le cas par exemple des eaux de transition comme les estuaires ou les mangroves.

Le but de ce travail de thèse a été de comprendre le comportement de nanoparticules de plastiques représentatives de l'environnement dans un gradient de salinité tel qu'on pourrait le retrouver dans les mangroves de Guadeloupe, et d'évaluer leurs toxicités dans ces zones particulières en utilisant des huîtres des Palétuviers *Isognomon alatus*.

Dans le chapitre 2, nous avons vu que les caractéristiques physicochimiques et morphologiques des nanoparticules déterminent leur comportement d'agrégation. Nous avons comparé plusieurs types de nanoparticules qui ont des caractéristiques plus ou moins proches des nanoplastiques que l'on peut trouver dans l'environnement. Ces derniers sont composés d'un mélange de plastique, ont des formes irrégulières, une surface oxydée, une distribution en taille continue ainsi que de la matière organique et des polluants éventuellement adsorbés à leur surface.

Le modèle le plus adapté pour représenter les nanoplastiques serait évidemment les nanoplastiques prélevés dans l'environnement. Néanmoins, le prélèvement, l'extraction et l'analyse des échantillons environnementaux sont des étapes délicates et se heurtent à des limites techniques et analytiques. Les modèles préparés en laboratoire seront donc une alternative plus simple et permettant un meilleur contrôle des caractéristiques physicochimiques et morphologiques des nanoparticules. Les latex de polystyrène sont clairement les plus éloignés des échantillons environnementaux de par leur forme sphérique, leur distribution monodispersée, et la présence d'additifs. Néanmoins, il est possible d'améliorer les PSL en les synthétisant de façon à maîtriser toutes les caractéristiques des nanoparticules, sans ajouter d'additifs, et en créant une surface oxydée contrôlée en quantifiant le nombre de fonctions $-COOH$. La fabrication de colloïdes par broyage permet de produire des nanoparticules de forme irrégulière, partiellement oxydée, sans ajout d'additifs et ayant une

large distribution en taille qui sont plus représentatives des nanoplastiques environnementaux. Le modèle le plus adapté pour représenter les nanoplastiques va dépendre du domaine d'étude.

En effet, pour les études physico-chimiques les modèles les plus adaptés seront les NPG ou bien les PS-ref et car ils sont représentatifs des particules environnementales par leur forme, leur distribution en taille, leur absence de surfactant, et leur surface oxydée. Les NPG sont les plus représentatifs car issus de plastiques secondaires. Ils ont une morphologie et des caractéristiques et physicochimiques de surface proches des nanoplastiques comme une forte oxydation de surface, une forme irrégulière, poreuse et fractale et éventuellement de la matière organique et des polluants adsorbés en surface. Les PS-ref, même si moins représentatifs, permettent un meilleur contrôle des caractéristiques des particules, car le type de polymère est connu et unique. Ils ont aussi l'avantage de ne contenir aucun colorant ni aucune substance inconnue provenant de l'environnement. Il est toutefois possible de ne préparer des NPG qu'avec un seul type de polymère. Les PS-ref et NPG sont adaptés pour étudier le comportement d'agrégation, l'étude de sorption de polluant, l'interaction avec la matière organique, le transport dans les milieux ou aux interfaces (colonne d'eau, zone de transition eau douce/eau de mer, sols, aquifères, glaces polaires...).

Dans le cas des études écotoxicologiques, les PSL issus du commerce ne sont pas recommandés, en particulier à cause de la présence d'additifs de composition inconnue potentiellement toxiques pour les organismes qui peuvent biaiser les résultats, et des fonctions de surface non contrôlables. La taille étant un facteur très important dans la biodisponibilité et les mécanismes d'entrée et de toxicité, les écotoxicologues voudront peut être se tourner vers des nanoplastiques modèles ayant une distribution monodispersée, de préférence stables dans le milieu, dans le cas où ils veulent uniquement étudier l'effet de la taille des particules. Il est alors préférable d'utiliser les PSL-COOH free soap, dont la taille et la quantité de fonctions -COOH sont contrôlable et qui ne contiennent pas d'additifs toxiques. L'avantage par rapport aux autres PSL est aussi que les fonctions -COOH les rapprochent des surfaces oxydées des nanoplastiques, contrairement aux PSL sans fonctions ou aux PSL aminés (-NH₂). Cependant, les PS-ref et les NPG sont plus représentatifs de l'environnement car, ils ont une forme irrégulière, et ne contiennent pas d'additifs toxiques. Les NPG permettent de faire une exposition réaliste car ils ont potentiellement des polluants (polluants organiques persistants, métaux traces) et de la matière organique adsorbés à leur surface. Néanmoins la qualification et la quantification exacte des polluants et de la matière organique peut s'avérer délicate, et il faudra alors se tourner vers les PS-ref pour mieux contrôler les paramètres de surface des particules. Il est aussi possible de les incuber avec des polluants connus, afin de contrôler les types et la quantité des polluants adsorbés et pouvoir éventuellement étudier des effets cocktails. La polydispersité des PS-ref rend la détermination de la distribution en taille peu précise surtout dans le cas où les particules s'agrègent dans le milieu.

Pour mieux évaluer le devenir et l'impact des nanoplastiques, nous avons proposé des modèles de particules représentatifs de l'environnement, dont les comportements d'agrégations sont similaires.

Nos résultats démontrent que (i) le mécanisme d'agrégation est influencé par la taille des particules, la forme, la composition de la surface et la concentration, (ii) les mécanismes

d'agrégation sont régis par le mode de dispersion, (iii) la dispersion dans des conditions dynamiques dans un gradient de salinité contrôle la taille finale de l'agrégat et la distribution des tailles qui restera stable est une solution aqueuse. Le passage des nanoparticules dans un gradient de salinité agirait comme un filtre provoquant l'agrégation de la majorité des particules mais aussi laissant passer des particules rendues stables par la dilution.

Ce nouveau moyen de disperser les nanoparticules dans un gradient de salinité permet d'exposer les organismes dans des conditions plus proches de l'environnement. Deux protocoles de dispersion ont été proposés, montrant tous les deux des effets toxiques différents des protocoles classiques de dispersion en batch. Ceci montre bien l'importance du mode de dispersion des particules lors des études écotoxicologiques. Les trois types de particules (NPG, PS-ref, PS latex carboxylatés) ont également montré des effets toxiques différents, ce qui illustre l'importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules dans la biodisponibilité, la translocation, les effets physiologiques et la toxicité cellulaire.

Les effets toxiques sont apparus à des concentrations très faibles et représentatives de l'environnement de l'ordre du $\mu\text{g L}^{-1}$. Les nanoplastiques peuvent donc véritablement être considérés comme un danger pour les écosystèmes de transition tels que les mangroves, les estuaires ou l'environnement marin. Ces travaux ont également permis d'identifier une partie du transcriptome d'*Isognomon alatus*, notamment des gènes d'intérêt dans les fonctions de défense cellulaire, ce qui permettra de faire d'autres études génétiques sur ce bivalve des mangroves tropicales, notamment directement *in situ*. Cela permettra d'obtenir plus d'informations sur le danger potentiel que subissent ces animaux face à la pollution anthropique.

Dans le dernier chapitre, nous avons présenté la technologie LIBD permettant de caractériser des nanoparticules à l'état d'ultra trace dans les milieux aqueux. Nous avons montré que les caractéristiques du laser influencent le seuil énergétique de création de plasma sur les nanoparticules en suspension. Il est donc important de bien connaître les caractéristiques du laser de l'instrument, et de faire une calibration complète chaque fois qu'une modification de l'instrument peut modifier le faisceau laser (changement du laser, changement ou déplacement des éléments optiques tels que les lentilles).

Les acquisitions de courbes en S avec le Magellan montrent qu'il est possible de faire des mesures de taille et de concentration de particules qui sont de taille nanométrique, à très faible concentration, peu importe le matériau même pour des particules transparentes, et ce dans des milieux différents. Les mesures de tailles, obtenues à partir des seuils des courbes en S, montraient des valeurs en accord avec les mesures DLS. Cependant, les estimations étaient réalisées par encadrement avec des courbes en S de PSL, de taille et de concentrations parfois éloignées des dispersions d'intérêt. Il serait judicieux d'améliorer la précision des mesures de taille, en établissant des courbes de calibration à partir de PSL de taille et de concentration connue. De cette façon, il serait possible de déterminer précisément si le matériau des particules a une influence sur la création des plasmas et donc sur le seuil des courbes en S. Les concentrations estimées par les mesures LIBD n'ont pas toujours été en accord avec les valeurs théoriques ou données par le constructeur. De ce fait, il faudrait vérifier la concentration en particule par microscopie électronique, ou avec un NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). La

qualification d'échantillons polydispersés est limitée et donne des informations moins précises que la DLS, le NTA ou la microscopie électronique, mais reste néanmoins possible comme nous l'avons vu avec les nanoparticules d'argent.

La LIBD est une technologie prometteuse qui permet d'avoir des informations sur des particules dans la gamme basse du nanomètre à des concentrations très faible de l'ordre de 10^4 à 10^{12} part mL^{-1} , là où d'autres technologies auraient atteint leurs limites de détection (DLS, NTA, A4F-SLS, microscopie optique...), ou perturberai la stabilité de l'échantillon (microscopie électronique). Le développement de protocole pour mesurer les nanoparticules dans les échantillons aquatiques environnementaux serait vraiment un plus, face au peu de technologies disponibles sur le marché actuellement pour mesure des traces des nanoparticules.

Dans cette étude, le système environnemental des mangroves a été simplifié en créant un gradient de salinité de quelques micromètres avec une solution de NaCl ou d'eau de mer artificielle. Le protocole de dispersion via la microfluidique mis au point durant cette thèse est unique et original et nous avons encore peu de recul quant à son efficacité et les mécanismes d'agrégation. Des études sont actuellement en cours pour compléter ces études en terme de caractérisation physique (DLVO, DLA et RLA) et chimique (hétéro-agrégation vs homo-agrégation). Du point de vue écotoxicologique, il serait intéressant de refaire des expositions avec en parallèle les protocoles A et B, avec des huîtres dans le même état physiologique, afin de pouvoir mieux comparer les effets écotoxicologiques induits par les nanoplastiques.

Néanmoins, les résultats sont très prometteurs, et démontrent l'importance de se rapprocher des conditions environnementales pour étudier la stabilité et la toxicité des nanoplastiques. Il serait intéressant de complexifier le système pour être plus proche de l'environnement, en ajoutant de la matière organique dans un premier temps puis en utilisant des eaux environnementales (ions divers, matière organique variée, biomolécules, matières en suspension, organismes microscopiques...). La capacité d'adsorption des polluants par les nanoplastiques dans un gradient de salinité pourrait être évaluée en ajoutant polluants organiques ou des métaux traces dans le milieu. Cette complexification pourrait apporter des informations nécessaires pour comprendre la stabilité, le transport, la biodisponibilité et la toxicité des nanoplastiques environnementaux.

D'un point de vue environnemental, les déchets plastiques présents dans les décharges ou accumulés dans la mangrove pourraient, en se dégradant, générer des nanoplastiques qui s'accumuleraient dans les eaux des mangroves par lessivage. De plus, ces nanoplastiques pourront adsorber ou auront potentiellement adsorbés les polluants à leur surface.

D'après nos résultats de microfluidique, les nanoplastiques pourraient diffuser vers le gradient de salinité par diffusiophorèse et s'agréger le long du gradient de salinité par collision. Il est très probable, compte tenu de la forte accumulation de matière organique dans les mangroves, qu'il y ait de l'hétéro-agrégation avec de la matière organique naturelle. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et notamment leur densité, les nanoplastiques pourraient sédimenter et éventuellement s'enfouir dans les sédiments, ou bien flotter à la surface. Les agrégats flottants pourraient perturber les organismes comme le phytoplancton ou la faune des racines de palétuviers. Les agrégats enfouis dans les sédiments pourraient, quant à eux, être nocifs pour les organismes benthiques (microorganismes, vers...) (Figure 99).

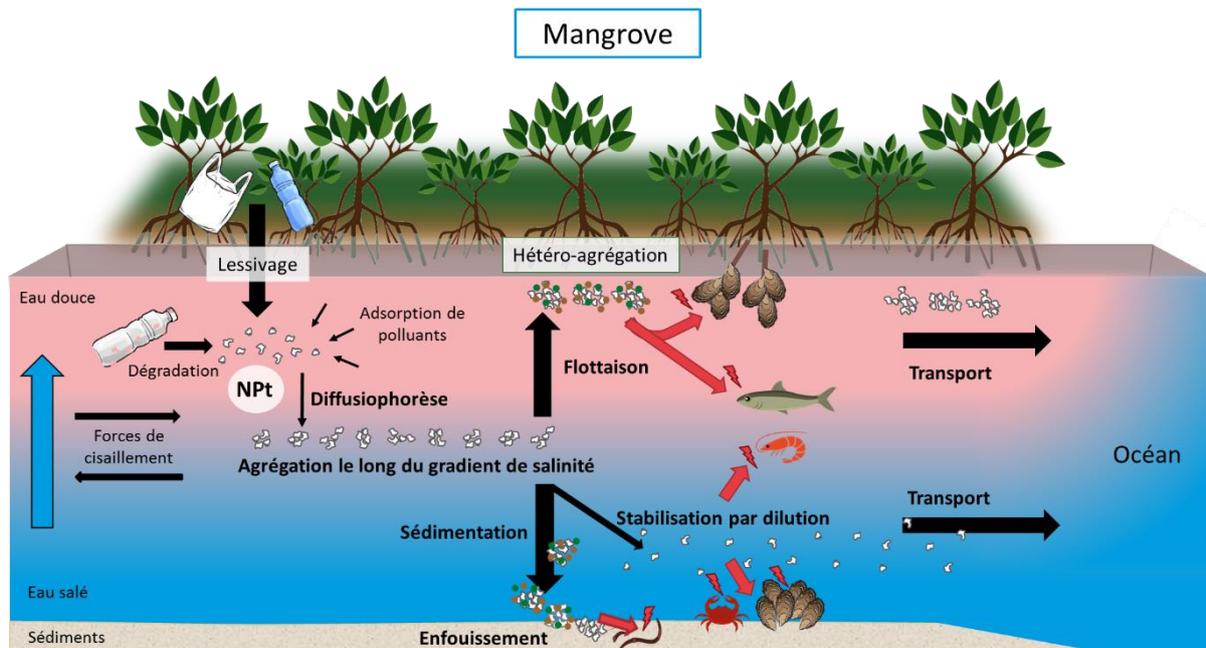


Figure 99 : devenir des nanoplastiques dans les mangroves

Mais une petite partie des nanoplastiques pourrait potentiellement passer au travers du gradient de salinité, produire des nanoparticules unitaires ou des petits agrégats inférieurs au micromètre qui seraient stabilisés par la forte dilution. Ces nanoplastiques stables dans l'eau salée pourraient, quant à eux, être toxiques pour tous les organismes vivant dans la colonne d'eau. C'est d'autant plus inquiétant qu'ils peuvent agir à très faible dose, dès le $\mu\text{g L}^{-1}$, avec effets délétères très marqués, comme le montrent nos résultats écotoxicologiques. Ce constat soulève des questions sur les effets généraux les répercussions environnementales et en particulier le transfert de ces nanoplastiques dans les réseaux trophique, et potentiellement jusqu'à l'homme : par le biais de la consommation d'huitres ou de poissons.

Par la suite, même si la mangrove joue un rôle de filtre en agrégeant la majorité des NP, les gros agrégats flottants et les petits agrégats stables dans la colonne d'eau pourraient être rejeté dans les océans par le biais des courants et des marées où ils pourront potentiellement parcourir de longues distances.

D'un point de vue écotoxicologique, la taille finale et la stabilité sont les paramètres les plus influents sur l'effet toxique (biodisponibilité, bioaccumulation, distribution des tissus et des organes, etc.). Ces résultats démontrent donc l'importance d'étudier le devenir et l'impact des plastiques dans les zones de transition comme les mangroves ou les estuaires, par rapport aux systèmes plus homogènes comme les océans, eau de surface type lacs... ; où la salinité la dynamique, la dilution et les conditions physiques et chimiques sont généralement constantes.

Annexe I : Algorithmes de la DLS

Je développerai ici ceux utilisés par le logiciel de Cordouan Technologies : Cumulant et *Sparse Bayesian Learning* (SBL) dont les principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau 20, et le type de résultats illustrés en Figure 100.

Tableau 20 : Caractéristiques des algorithmes Cumulant et SBL.

	Cumulant	SBL
Équation de départ	$g_2(\tau) = A \cdot e^{-2q^2 D \tau} + B$	$g_1(\tau_i) = \int_0^\infty P(\Gamma) e^{-\Gamma \tau_i} d\Gamma$
Résultat obtenu	Z-average + PDI	Distribution en taille
Potentiel	Adapté pour les échantillons monodispersés. Donne une seule valeur associée à un PDI.	Adapté pour les échantillons polydispersés.
Limitations	Non adapté pour les échantillons polydispersés	Plusieurs solutions possibles pour une même courbe d'autocorrélation

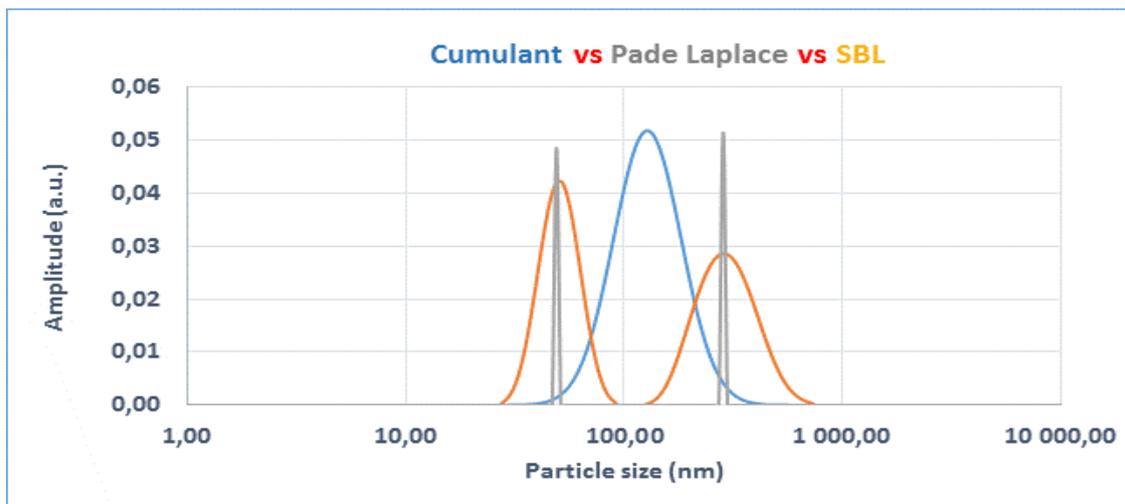


Figure 100: solution à la courbe d'autocorrélation selon les algorithmes Cumulant, Padé Laplace et SBL (Cordouan technologies).

V.1.1 Algorithme Cumulant

La méthode d'analyse Cumulant a été originellement proposée par Koppel (1972) puis encadré par la norme ISO 13321 . Cet algorithme est utilisé pour des distributions monomodales en utilisant l'équation de la courbe d'autocorrélation vue précédemment (Équation 10). Le diamètre hydrodynamique moyen (Z-average ou D_{zh}) est obtenu à partir de l'équation de stock Einstein et du taux de décroissance moyen :

$$D_{zh} = \frac{k_B T q^2}{3\pi\eta\bar{\Gamma}}$$

La polydispersité de l'échantillon est évaluée en utilisant l'indice de polydispersité PDI calculé à partir de l'équation de cumulant d'ordre 2, comme préconisé dans la norme ISO 13321:

$$PDI = \frac{\mu_2}{\bar{\Gamma}^2}$$

Le PDI représente la variance de la distribution normale de taille autour de sa moyenne. Quand le PDI est inférieur à 0,05 il est considéré que la distribution des particules est monovalente, comme c'est le cas pour les latex de polystyrènes standards. Entre 0,1 et 0,7 la dispersion en taille est considérée comme moyenne. Quand le PDI est supérieur à 0,7 la distribution en taille est considérée comme large et l'échantillon est dit polydispersé (Stetefeld et al., 2016).

L'algorithme Cumulant permet de déterminer une taille moyenne avec un indice de polydispersité. Il est peu adapté pour les échantillons avec des distributions en taille larges. D'autant plus que dans le cas d'échantillons polydispersés, des distributions en taille différentes peuvent générer des fonctions d'autocorrélations similaires.

V.1.2 Algorithme SBL

L'algorithme d'apprentissage Bayésien dispersé (*Sparse Bayesian Learning*, SBL) est basé sur les travaux de Tipping (2001). Il permet de proposer les solutions les plus probables à la courbe d'autocorrélation en auto-apprentissage, sans apriori sur la distribution en taille.

Pour trouver la distribution en taille des particules (*particle size distribution*, PSD) : $P(\Gamma)$, il faut résoudre une équation de Fredholm du premier type par une inversion de la transformée de Laplace-(Nyeo and Ansari, 2011) :

$$g_1(\tau_i) = \int_0^\infty P(\Gamma)e^{-\Gamma\tau_i}d\Gamma, \quad i = 1,2,\dots,M \quad \text{Équation 21}$$

L'algorithme SBL appliqué au traitement des données DLS est détaillé dans la publication de (Nyeo and Ansari, 2011).

La méthode de la courbe en L permet de déterminer la solution la plus probable à la courbe d'autocorrélation. Cette méthode permet de trouver un compromis entre sous-ajustement et sur-ajustement des données. Toutes les solutions sont affichées sur un graphique logarithmique représentant la norme des résidus de la courbe d'ajustement (*fit*) en fonction de la norme des solutions. Le point qui se trouve à l'intersection des deux droites perpendiculaires (formant un L) comme illustré en Figure 101, est théoriquement la meilleure solution présentant le meilleur rapport : lissage de la courbe vs minimisation des résidus.

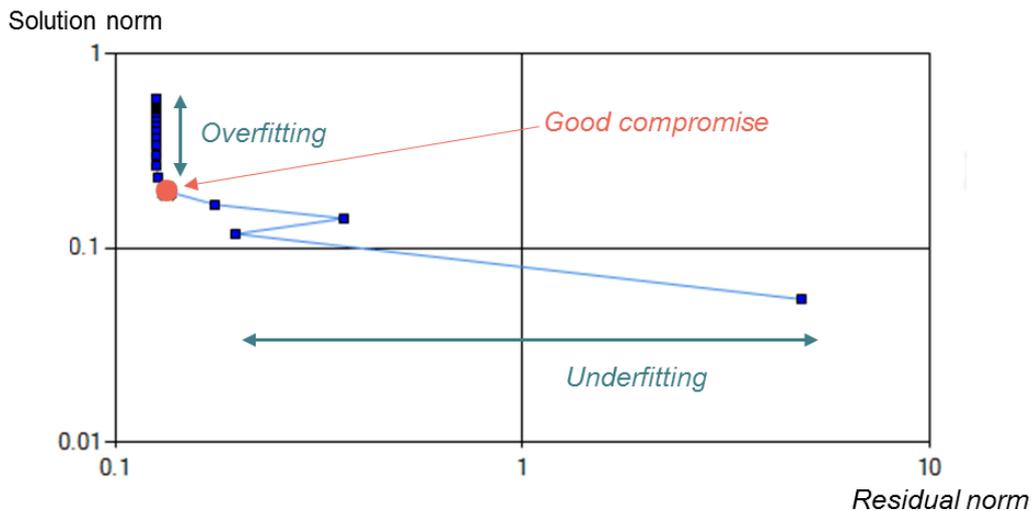


Figure 101: Représentation des solutions SBL sous la forme d'une courbe en L. La meilleure solution est un compromis entre sur- et sous-ajustement des données, et se trouve à l'angle de la courbe en L.

Cet algorithme est particulièrement adapté pour déterminer la distribution en taille d'échantillons poly dispersés. Il permet d'obtenir des distributions en taille de chaque population de taille comme illustré sur la Figure 100. La conversion de la courbe d'autocorrélation en coefficient de diffusion est telle que de petites variations peuvent entraîner des résultats très différents. Ceci est accentué par le fait que l'intensité diffusée par des grosses particules domine celles des petites. Il peut également arriver qu'il y ait plusieurs solutions, et donc plusieurs distributions en taille possibles pour une même courbe d'autocorrélation. C'est alors à l'utilisateur de choisir la meilleure solution en fonction des données connues de l'échantillon (Hasselov et al., 2008).

Annexe II : Composition des milieux

Tableau 21: Composition de l'eau de mer artificielle Instant Ocean®, pour une salinité de 35 ppt.

Ion	Concentration (ppm)	Ion	Concentration (ppm)
Chloride	19.29	Chromium	<0.015
Sodium	10.78	Cobalt	<0.015
Sulfate	2.66	Copper	<0.015
Magnesium	1.32	Nickel	<0.015
Potassium	420	Selenium	<0.015
Calcium	400	Vanadium	<0.015
Carbonate/bicarbonate	200	Zinc	<0.015
Bromide	56	Molybdenum	<0.01
Strontium	88	Aluminium	<0.006
Boron	5.6	Lead	<0.005
Fluoride	1	Arsenic	<0.004
Lithium	0.3	Cadmium	<0.002
Iodide	0.24	Nitrate	None
Barium	<0.04	Phosphate	None
Iron	<0.04		
Manganese	<0.025		

Tableau 22: Composition du milieu Dauta (sans ajout d'EDTA).

Composants	Concentration (mg/l)
KNO ₃	200
NaHCO ₃	50
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	28,42 (10 mg/L SI)
MgSO ₄ , 7H ₂ O	25
CaCl ₂ , 2H ₂ O	25
K ₂ HPO ₄	25
Na ₂ CO ₃	5
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,4
Na ₂ Mo ₄	0,035
ZnSO ₄	0,02
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,02
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,01
H ₃ Bo ₃	0,001

Tableau 23: Composition du milieu F/2. Les composants sont rajoutés à de l'eau de mer filtrée pour un volume final d'un litre.

Composants	Concentration (mol/l d'eau de mer)	Concentration finale (mg/l d'eau de Mer)
NaNO ₃	8.83.10 ⁻⁴	75
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	3.63.10 ⁻⁵	5
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	1.07.10 ⁻⁴	30 (3 mg SI)
Métaux traces		
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1.10 ⁻⁵	4.36
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1.10 ⁻⁵	3.15
MnCl ₂ , 4H ₂ O	9. 10 ⁻⁷	0.18
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8. 10 ⁻⁸	0.022
CuSO ₄ , 5H ₂ O	4.10 ⁻⁸	0.01
CoCl ₂ , 6H ₂ O	5. 10 ⁻⁸	0.01
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	3. 10 ⁻⁸	0.006
Vitamines		
Thiamine HCl (vit.B1)	2.96.10 ⁻¹	0.1
Biotine (vit. H)	2.05.10 ⁻⁹	0.0005
Cyanocobalamine (vit. B12)	3.69.10 ⁻¹⁰	0.0005

Annexe III : Cinétiques d'agrégation en batch et dans un gradient de salinité

Tableau 24 : Vitesses d'agrégation (moyenne et écart type quand plusieurs répliques disponibles) des PSL 200, PS-ref, à différentes concentration massique et dans des milieux de différentes salinité (NaCl, Eau de mer artificielle, milieu Dauta et F/2). La concentration particulaire des PS-ref est calculée en approximant la distribution en taille à une population monodispersée de sphères de 400 nm de diamètre.

Particule	Concentration massique en NP (ppm)	Concentration particulaire (part./ml)	Concentration en NaCl (g/l) ou milieu	Pente (nm/min)	Écart type
PSL 200 nm	100	2.31E+10	50	114.990	
			45	110.550	
			40	72.796	
			30	9.302	3.27
			20	1.062	1.27
			15	0.315	
			10	0.471	
			5	-0.574	
			F/2	112.710	
	20	4.61E+09	30	15.057	6.03
			F/2	43.115	
	11	2.50E+09	30	12.172	7.19
			F/2	20.878	
2	4.55E+08	30	1.514		
1	2.27E+08	F/2	3.713		
PS-ref	11	3.13E+08	45	189.324	238.9
			40	26.474	14.36
			35	14.741	1.67
			30	15.399	3.26
			20	9.825	0.57
			10	14.774	
			5	13.105	
			EdM	21.312	
			1	3.13E+07	30
			EdM	7.556	2.0
		F/2	13.396	1.6	
		Dauta	2.085		

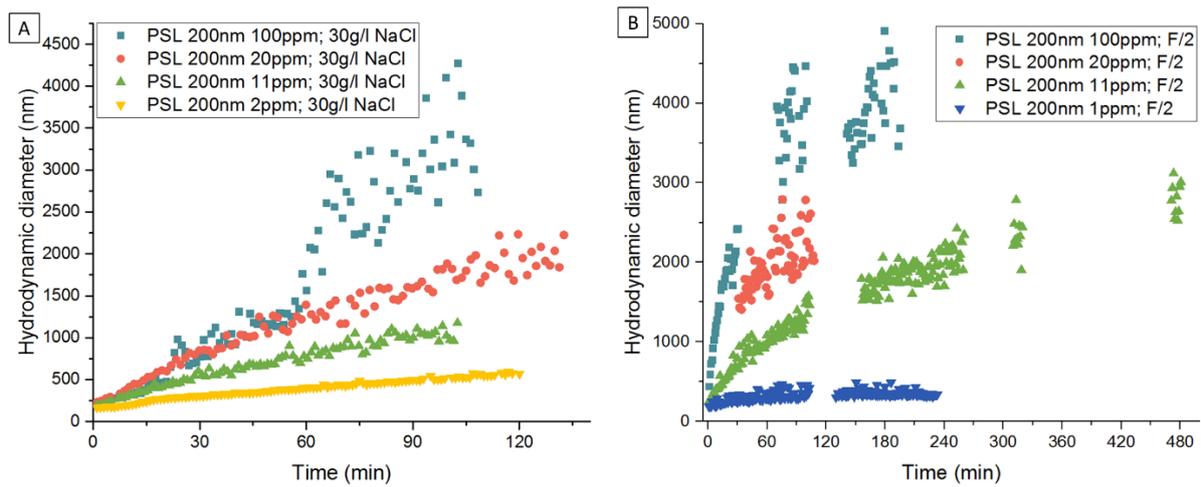


Figure 102 : Influence de la concentration en particule sur la cinétique d'agrégation des PSL 200nm A) dans une solution de NaCl à 30g L⁻¹, B) Dans le milieu de culture F/2.

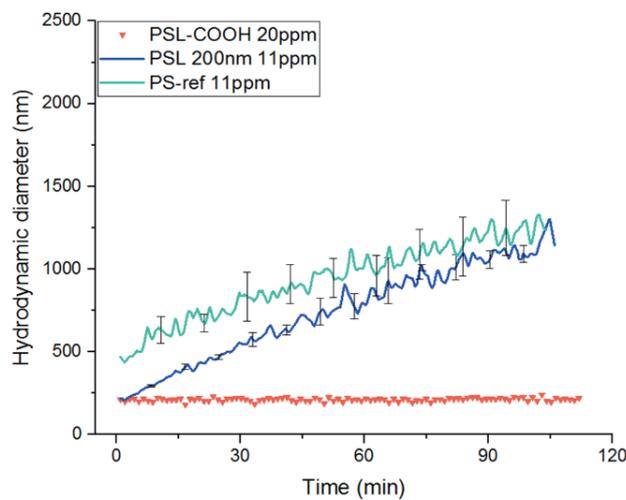


Figure 103: Cinétique d'agrégation des PSL 200 nm (11 ppm), PS-ref (11 ppm) et PSL-COOH (20 ppm) dans une solution de NaCl 30 g L⁻¹ moyenne ± écart type pour les PSL et les PS-ref.

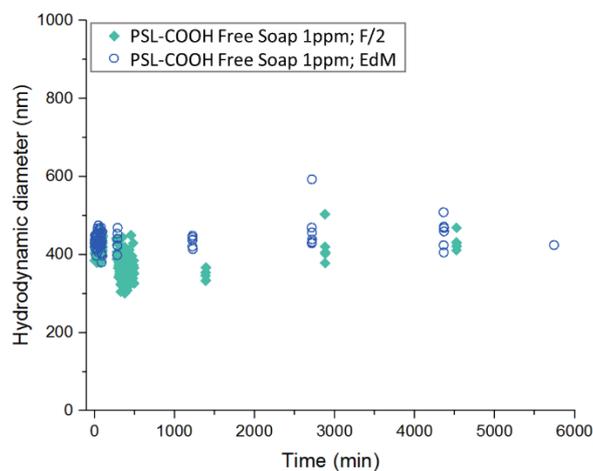


Figure 104 : Cinétique d'agrégation des PSL-COOH free soap (1 ppm), dans le milieu F/2 et l'eau de mer artificielle pendant 4 jours.

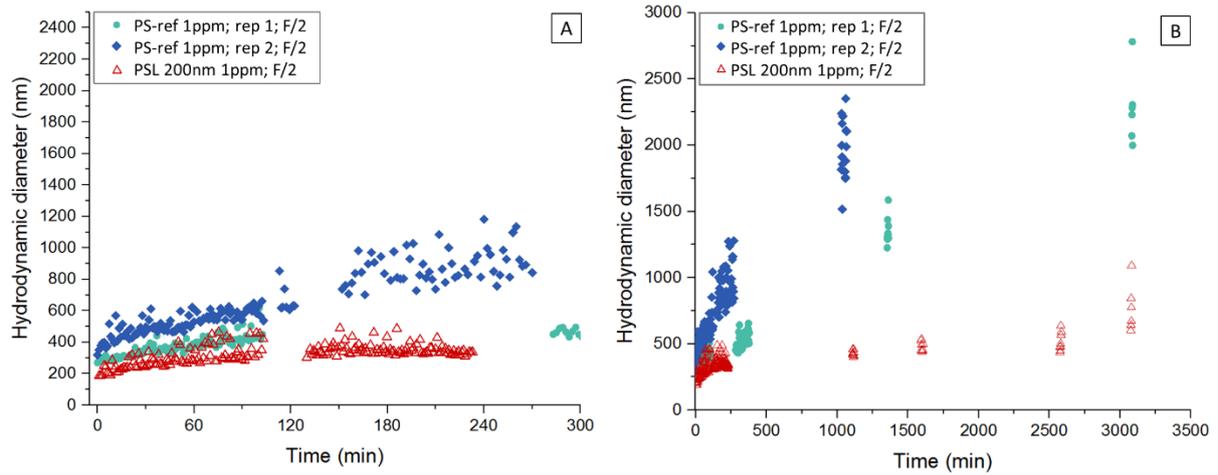


Figure 105: Cinétique d'agrégation des PSL 200nm et PS-ref (1 ppm) dans les milieux de culture F/2. A) cinétique à court terme; B) cinétique à long terme (de 16 heures à 2 jours) dans le milieu F/2. Les PS-ref s'agrègent plus vite que les PSL.

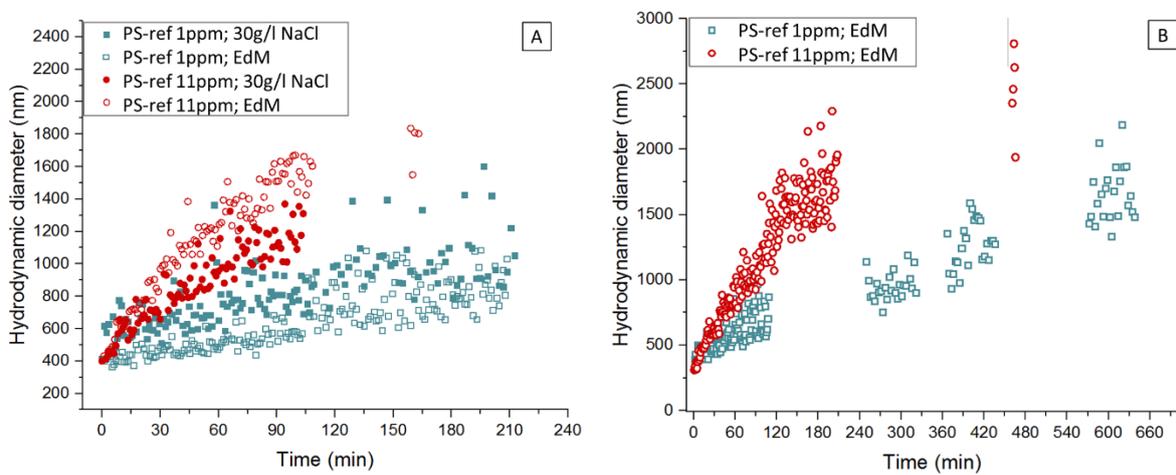


Figure 106 : Cinétique d'agrégation des PS-ref (1 et 11 ppm) dans de l'eau de mer artificielle en mode batch. A. comparaison avec l'agrégation dans une solution de NaCl 30g/l à court terme. B. cinétique d'agrégation à plus long terme.

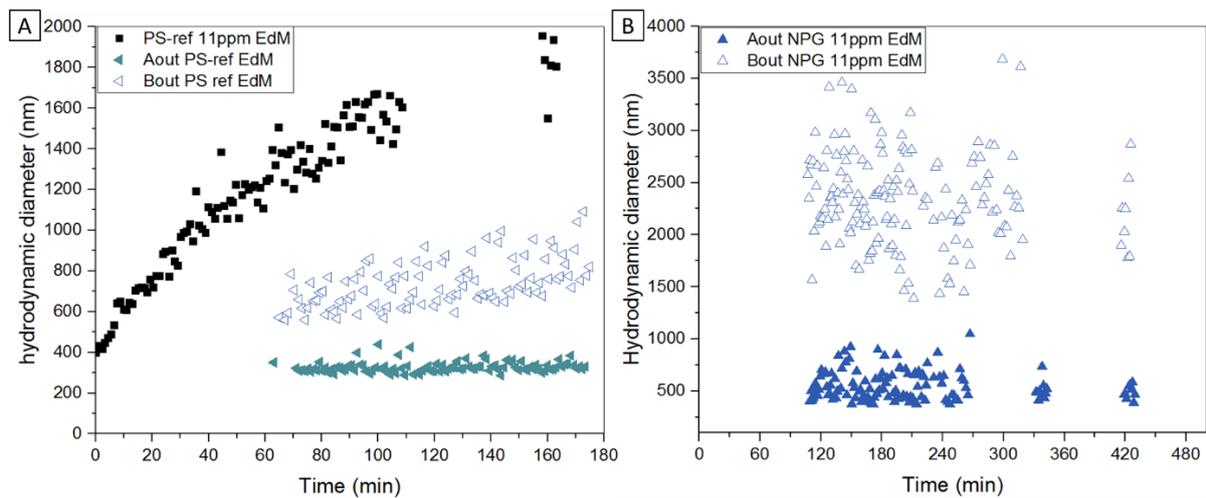


Figure 107 : Nanoparticules (11ppm) dispersés dans un gradient d'eau de mer artificielle (EdM, 30g/l). A. Comparaison des cinétiques d'agégation des PS-ref en Aout et Bout avec l'agrégation en batch à 11ppm dans de l'eau de mer artificielle. B. Cinétiques d'agrégation des NPG en sortie Aout et Bout.

Annexe IV : Séquence des amorces

β -actine	β actineIsognomonSq AACGAGCGATTGATGTCC	β actineIsognomonASq cgATTCCTGGGtACATGGTT
rpl7	RPL7IsognomonSq CCCAGGAAGGTCATGCAGTT	RPL7IsognomonASq TCCCAGAGCCTTCTCGATGA
bax	BaxIsognomonSq AACTGGGGCAGAGTTGGATG	BaxIsognomonASq AATTGCTTCCCAGCCTCCTC
cat	CATIsognomonSq CGAGGCTAGCCCAGACAAAA	CATIsognomonASq TTGGGGAAATAGTTGGGGGC
cav	CAVIsognomonSq CGTCGAGATCCAGACCTGTT	CAVIsognomonASq ACAGCATTGACTGCGTATGG
cltc	CLTCIsognomonSq AGACTCAGGACCCAGAGGAC	CLTCIsognomonASq ATCACACGGGTTCTATCGGC
cox	CoxIsognomonSq GTTGCCTTGGTCGCTAGACT	CoxIsognomonASq GAGCGTCTTGGGCTTAGTCA
gadd45	GADD45aIsognomonSq TTGGCTTGACAAAAGTGCCG	GADD45aIsognomonASq CTGACAACCTGCATCTCGGT
gapdh	GAPDHIsognomonSq CACGGCAACACAGAAGGTTG	GAPDHIsognomonASq CCCTTCTGAAGTCGGCAAGT
mdr	MDRIsognomonSq GCATGTTGCAAGCCTGTCAA	MDRIsognomonASq CAGTCAACTCAAGCAACCGC
p53	p53IsognomonSq CGATGATCGGGTTCAGCAGA	p53IsognomonASq GAGCTCTCTAACACAGCCA
sod1	SOD1IsognomonSq AGACTGCGTCACATGCTTCA	SOD1IsognomonASq GCGTCATGTAGGGGATCTGG
12s	12SIsognomonSq TCAGGTGTTACACAGCCGTC	12SIsognomonASq GCAGGCGTTTTAATCCCGTC

Annexe V : Exposition directe des huîtres selon le protocole B

Cette exposition a été réalisée en collaboration avec Marc Lebordais. Lors de cette expérimentation ce lot d'huître n'a pas bien supporté les conditions de maintien en laboratoire, contrairement aux lots précédents. Nous avons observé de la mortalité dans les groupes témoins (3 huîtres) ainsi que dans les conditions NPG $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (1 huître), PS-ref $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (2 huîtres) et $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (1 huître), PSL $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (1 huître) et $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (1 huître).

Après 7 jours d'exposition aux nanoparticules de plastiques, les huîtres sont disséquées pour prélever les branchies et les masses viscérales nécessaires aux analyses. Les organes de deux huîtres contaminées dans le même bocal ont été rassemblés en pool de deux pour avoir une masse suffisante et ensuite divisés pour les différentes analyses : transcriptomique et induction de metallothionéines. Les échantillons destinés à la transcriptomique ont été conservés dans du *RNA later* à -80°C . Ceux destinés à l'analyse des metallothionéines ont été conservés à -80°C sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation des tissus.

V.1.3 Indices de condition

L'indice de condition a été calculé à partir du rapport du poids du corps mou sur le poids de la coquille (en poids frais). Cet indice permet d'avoir des informations sur l'état de santé des huîtres, en termes de croissance ou de reproduction.

Il n'y a pas de différence significative entre les indices d'embonpoint des huîtres contaminées par rapport au groupe témoin.

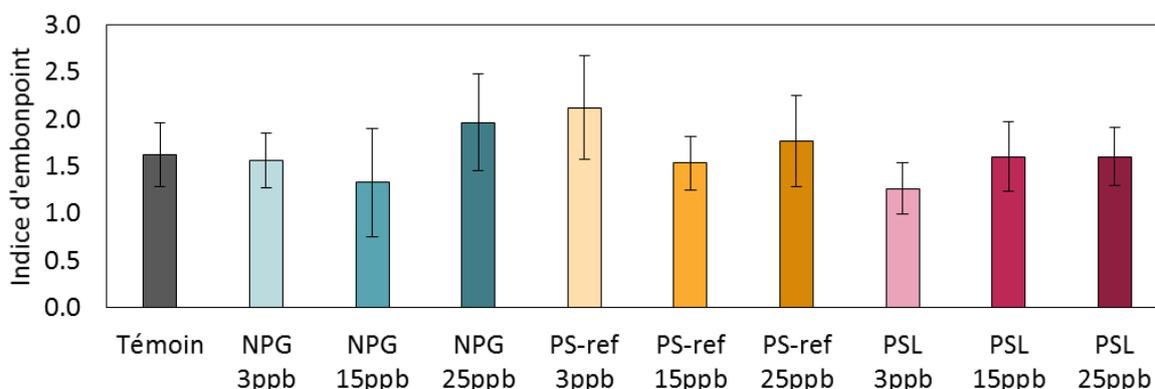


Figure 108 : Indices de condition des huîtres à la fin de l'exposition.

V.1.1 Méthallothionéines

Les metallothionéines (MT) sont des protéines de faible poids moléculaire impliquées dans l'homéostasie des métaux essentiels chez tous les eumétazoaires (règne animal). Elles sont particulièrement riche en soufre (30% de cystéines) ce qui leur permet de chélater les métaux des groupes IB et IIB (Cu^{2+} , Ag^+ , Au^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). Elles peuvent chélater jusqu'à 7 ions métalliques divalents. Lors d'une contamination métallique de l'organisme la

détoxication entre en compétition avec le maintien de l'homéostasie cellulaire (Kägi and Schäffer, 1988). Ainsi lors d'une contamination aigüe en Cu ou Zn qui sont pourtant des métaux essentiels, il va y avoir une synthèse plus importante de MT (Baudrimont et al., 2005). Cette compétition est accentuée dans le cas d'une contamination à des ions non essentiels, car l'affinité des metallothionéines est différente selon les métaux : Hg>Cu>Cd>Zn. Ainsi les ions de mercure ou de cadmium peuvent remplacer les ions essentiels comme le Zinc (Day et al., 1984).

Les MT sont également produites lors d'un stress oxydant car la génération de radicaux comme le H₂O₂ sont inducteurs du gène *mt* codant pour les MT (Figure 109) (Baudrimont et al., 2005; Gonzalez et al., 2006; Roesijadi et al., 1997; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Toutefois, de tous les facteurs d'activations répertoriés (métaux, stress oxydant, hormones, messagers secondaires, agents cytotoxiques, agents inflammatoires), les métaux induisent la plus forte induction des MT.

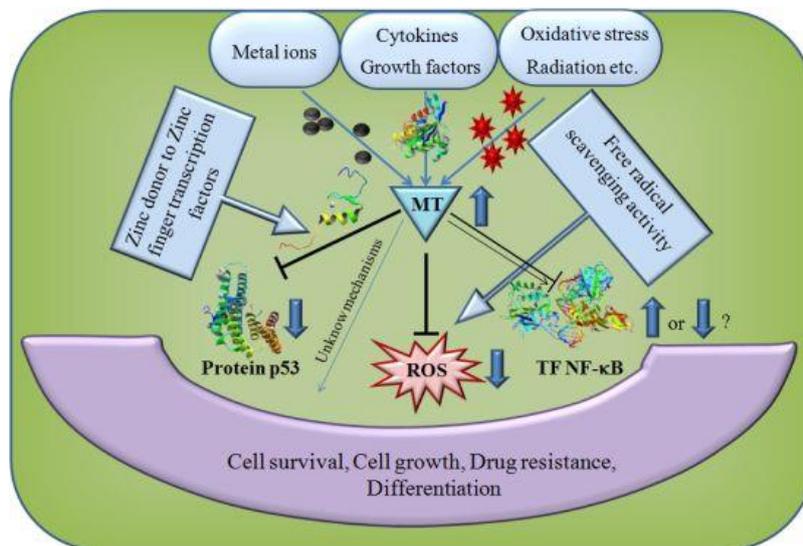


Figure 109 : Processus impliqués dans la production de metallothionéines ((Ruttkay-Nedecky et al., 2013)

Le dosage de la quantité de MT dans les tissus est réalisé par la méthode de saturation au mercure (Mercury-Saturation Assay (MSA) selon le protocole établi par Baudrimont (1997).

Les tissus sont broyés (UltraTurrax IKA T10) dans du tampon Tris 25 mM glacé (Sigma, pH 7,2 à 20°C), avec une dilution d'un facteur 9 à 30 par rapport au poids du tissu. La faible température permet de libérer le contenu cellulaire sans altérer les macromolécules, en bloquant l'action des enzymes (protéases). Le broyage est effectué dans une boîte à gants sous atmosphère d'azote pour minimiser l'oxydation des MT.

L'ensemble est ensuite centrifugé (20 000 g pendant 60 min, à 4°C, Sigma 3K12, rotor 12154) pour éliminer les débris membranaires et 200 µl de surnageant sont récupérés pour être mis en contact avec 200µl de solution de mercure HgCl₂ (Merck) (50 mg Hg L⁻¹ dans 10% d'acide trichloroacétique (Sigma)). Le mercure Hg(II) en excès va remplacer tous les métaux éventuellement présents sur les MT et saturer tous les sites de chélation. Après 10 min d'incubation, l'addition d'hémoglobine de bovin va permettre de capter le mercure

« aspécifique », c'est-à-dire celui adsorbé sur les autres molécules que les MT et celui dissous en solution. L'affinité Hg-MT est plus forte que l'affinité Hg-Hb. Le mélange est rapidement centrifugé à 20 000 g pendant 20 min afin de sédimenter l'hémoglobine et pour éviter le transfert des Hg(II) depuis les MT vers l'hémoglobine. Le surnageant final est digéré dans 3 ml d'acide nitrique pur pendant 15 min avant de doser la quantité de mercure par spectrophotométrie d'absorption (LECO AMA 254, Altec). Un standard interne (Fish Homogenate IAEA 407) permet de connaître l'efficacité de l'instrument. On en déduit la quantité de mercure par g de tissus. Trois échantillons de référence (blancs) sont également préparés selon le même protocole. Ils sont constitués de tampon Tris, de HCl et d'hémoglobine de bovin pour vérifier l'efficacité de complexation du Hg(II) et de l'hémoglobine. Trois échantillons de MT purifiées diluées dans du tampon Tris à 10 µg MT mL⁻¹ provenant de foie de lapin (Sigma M-7641) sont également préparés selon le même protocole. Ce sont des standards internes qui permettent de connaître le ratio entre les sites de liaisons mesurés après la saturation au mercure et les potentiels sites de liaison indiqués par le fabricant pour le Cd, Zn, et Cu. Dans notre cas le pourcentage de récupération est toujours de l'ordre de 100 ± 10%.

La concentration en MT est ensuite exprimée en nmol de sites de fixation de mercure par gramme de poids frais (pf) selon la formule suivante:

$$\text{site de HG (pf)} = \frac{m(\text{Hg})_{\text{échantillon}}}{V_{\text{surnageant}} \cdot \frac{\text{facteur de dilution}}{M(\text{Hg})}}$$

La quantité exacte de sites de fixation de mercure par MT est inconnue pour cette espèce, il n'est pas donc possible de calculer le nombre de moles de MT g⁻¹ (pf).

V.1.2 Production de métallothionéines

Globalement, la production de métallothionéines (MT) diminue quand les huîtres sont exposées aux trois types de nanoparticules par rapport aux témoins (Figure 66). Cette diminution est significativement différente des témoins pour les huîtres exposées aux NPG concentrés à 3 et 15 µg L⁻¹ ainsi qu'aux PS-ref à 15 µg L⁻¹ et aux PSL-COOH free soap à 15 µg L⁻¹. La diminution de la production n'est en revanche pas significative pour la condition NPG 25 µg L⁻¹. Concernant les NPG, on observe un effet dose réponse, dont le maximum d'effet est produit à la plus faible concentration en particules.

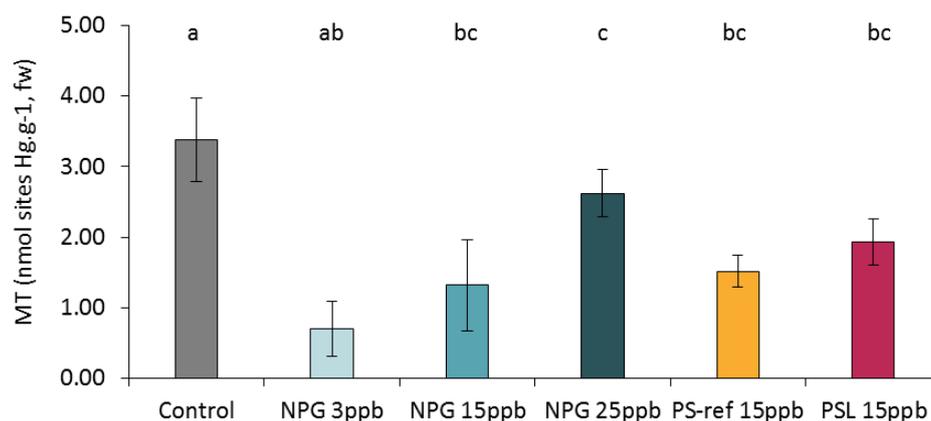


Figure 110: Concentrations en métallothionéines (MT, nmol site Hg g⁻¹ pf, moyenne± erreur type, n=3) dans les branchies d’huîtres exposées aux NPG, PS-ref et PSL-COOH free soap. Les lettres indiquent les différences significatives p<0,05.

V.1.3 Expression précoce des gènes

L’expression basale des gènes chez les témoins est relativement similaire entre les deux organes. Néanmoins les gènes *cav* et *bax* ont une expression plus importante dans les branchies, et les gènes *cltc*, *cat*, *cox* et *gapdh* dans les masses viscérales. Comparée à l’expérimentation précédente (protocole A), seuls les gènes *sod1* et *12s* diffèrent, car ils ne sont pas plus exprimés dans les branchies et les masses viscérales respectivement.

Tableau 25 : Expression basale moyenne des gènes dans les branchies et les masses viscérales des huîtres témoin, relativement aux gènes de référence (β -actine et RPL7).

Fonction	Gene	Branchies	Masse viscérale
Endocytose	<i>cav</i>	0.023	0.001
	<i>cltc</i>	0.020	0.035
Stress oxydant	<i>cat</i>	0.064	0.212
	<i>sod1</i>	0.012	0.019
Detoxification	<i>mdr</i>	0.002	0.002
Métabolisme mitochondrial	<i>12s</i>	9.259	8.111
	<i>cox1</i>	0.330	1.092
Réparation de l’ADN	<i>gadd45</i>	0.105	0.163
Apoptose	<i>gapdh</i>	0.011	0.037
	<i>bax</i>	0.025	0.015
	<i>p53</i>	0.030	0.027

Les NPG induisent des effets sur l’expression précoce des gènes qui suivent un effet dose réponse en cloche (**Tableau 26**)

Tableau 26 : Facteurs d'induction (>1) ou de répression (<1) des gènes cibles par rapport aux conditions témoins dans les branchies et la masse viscérale. Uniquement les résultats statistiquement significatifs sont présentés, - : identique aux valeurs du groupe témoin. NA : non disponible (non available)

Organe et fonction	Gène	NPG			PS-ref			PSL-COOH free soap		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
		3 µg L ⁻¹	15 µg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹	3 µg L ⁻¹	15 µg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹	3 µg L ⁻¹	15 µg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹
Branchies										
Endocytose	<i>cav</i>	-	3,20	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cltc</i>	-	3,69	-	-	-	-	-	-	-
Stress oxydant	<i>cat</i>	-	-	2,01	-	-	0,38	-	-	-
	<i>sod1</i>	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
Métabolisme mitochondrial	<i>12s</i>	-	4,36	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cox1</i>	5,46	3,44	-	-	-	-	-	4,21	2,89
Réparation de l'ADN ou apoptose	<i>p53</i>	3,76	-	-	-	-	-	-	-	-
Réparation de l'ADN	<i>gadd45</i>	-	2,93	-	-	-	-	-	1,80	-
Apoptose	<i>bax</i>	-	0,34	2,15	-	-	-	-	-	0,49
Réparation de l'ADN, apoptose ou Stress oxydant	<i>gapdh</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Détoxication	<i>mdr</i>	-	14,35	-	-	-	-	-	-	-
Masses viscérales										
Endocytose	<i>cav</i>	-	88,27	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cltc</i>	-	NA	-	-	-	1,77	-	1,76	-
Stress oxydant	<i>cat</i>	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sod1</i>	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
Métabolisme mitochondrial	<i>12s</i>	-	1,90	0,56	1,61	-	-	-	-	-
	<i>cox1</i>	2,5	2,16	-	2,74	2,51	2,52	-	2,18	2,14
Réparation de l'ADN ou apoptose	<i>p53</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Réparation de l'ADN	<i>gadd45</i>	-	-	-	-	1,80	2,20	-	-	-
Apoptose	<i>bax</i>	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
Réparation de l'ADN, apoptose ou Stress oxydant	<i>gapdh</i>	-	NA	-	-	-	2,05	-	-	-
Détoxication	<i>mdr</i>	-	12,27	-	-	-	-	-	-	-

À la concentration de $3 \mu\text{g L}^{-1}$, alors qu'il n'y a aucune induction des gènes impliqués dans les voies d'endocytose, un stress respiratoire est observé avec l'induction de *cox1* dans les branchies et les masses viscérales (x 5,5 et x 3,6 respectivement), et des dommages à l'ADN car *p53* est induit dans les branchies (x 3,8) dans le but de réparer l'ADN. Cela pourrait signifier un effet indirect des nanoplastiques par leur simple adsorption à la surface des membranes cellulaires. A la concentration de $15 \mu\text{g L}^{-1}$, il y a plus de gènes dont l'expression est modifiée que dans les autres conditions, surtout dans les branchies. Tout d'abord, les gènes de l'endocytose sont induits dans les deux tissus, et le facteur est particulièrement élevé pour *cav* dans les masses viscérales (x 88.3). Les nanoplastiques sont donc entré dans les cellules. Dans ce cas, il n'y a pas de stress oxydant, mais une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les branchies (*12S* et *cox1* \approx x 4), et les masses viscérales (*cox1* x 2.2), et la détoxification cellulaire est particulièrement stimulée avec des facteurs d'induction >12 dans les branchies et les masses viscérales pour *mdr*.

A la concentration de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, peu d'effets sont observés. Un stress oxydant est généré dans les branchies par l'induction de *cat* d'un facteur 2, et l'induction du gène *bax* (x 2,1) correspondant au déclenchement de l'apoptose, alors qu'encore une fois, les voies de l'endocytose ne sont pas stimulées.

Les PS-ref induisent des effets essentiellement dans les masses viscérales au niveau du métabolisme mitochondrial avec une induction de *cox1* similaire dans les trois conditions, aux alentours de 2,5. L'induction de *gapdh* et *gadd45* (\approx x2) à la concentration de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ signifie qu'il y a un besoin de réparer l'ADN.

Les PSL-COOH free soap provoquent l'induction de *cox1* dans les branchies et les masses viscérales aux concentrations de 15 et $25 \mu\text{g L}^{-1}$, sans stimulation des voies d'endocytose. L'induction est plus forte dans les branchies à la concentration de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ (x 4.2) comparativement à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ (x 2.89). Il n'y a pas de différence par rapport aux témoins pour la concentration $3 \mu\text{g.L}^{-1}$.

V.1.4 Discussion

Il est plutôt étonnant de voir une diminution de la production de metallothionéines lors d'une contamination par des xénobiotiques toxiques. Alors que les MT sont censées maintenir l'homéostasie des métaux essentiels, protéger contre l'exposition aux métaux traces ou protéger contre le stress oxydant, ici la production de ces protéines est inhibée en présence des 3 types de nanoplastiques, et ceci, surtout à faible concentration (3 et $15 \mu\text{g.L}^{-1}$). Cela, pourrait signifier que les NPG ne relarguent pas de métaux trace, et que les trois types de nanoparticules n'induisent pas de stress oxydant, ce qui est cohérent avec ce qui est observé au niveau de l'expression des gènes dans les branchies. Cela pourrait témoigner aussi d'un impact toxique direct des nanoplastiques sur la synthèse protéique. Cependant, l'homéostasie nécessite d'être maintenue et cette diminution de la production de metallothionéines pourrait également signifier que l'énergie nécessaire au maintien des fonctions vitales est redirigée vers d'autres fonctions comme respiration mitochondriale et la réparation de l'ADN (Arini et al., 2015; Paul-Pont et al., 2010).

Il est à noter également que le lot d'huîtres utilisé pour l'expérimentation n'a pas bien supporté les conditions de maintien en laboratoire, contrairement aux lots précédents. En effet, plusieurs huîtres sont mortes pendant l'exposition y compris dans les groupes témoins. Cette baisse de la production peut donc aussi être due au mauvais état de santé des huîtres, qui face à une exposition de nanoparticules se trouvent encore plus affaiblies.

Concernant l'expression précoce des gènes, dans l'ensemble il y a des faibles niveaux d'induction et un faible nombre de gènes induits, surtout si ces résultats sont comparés à ceux de l'expérimentation précédente utilisant le protocole A, pour les 2 premiers niveaux d'exposition (3 et 15 $\mu\text{g L}^{-1}$). Ceci dénote que l'énergie n'est pas autant allouée à la défense que suggéré précédemment, ou tout simplement qu'il n'y a plus assez d'énergie pour les systèmes de défense dépendant de la production d'ATP comme le transporteur ABC.

L'indice de condition ne montre pas de différence entre les témoins et les huîtres exposées, ce qui signifie que les NP n'induisent pas de perte de poids chez les huîtres au cours des 7 jours d'exposition.

Si nous comparons les trois types de particules, les NPG sont celles qui induisent le plus d'effets délétères et en particulier au niveau des branchies aux concentrations de 15 et 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ces nanoplastiques contiennent des métaux adsorbés à leur surface et potentiellement des polluants organiques, ont une forme irrégulière et présentent une forte oxydation de surface (proche de 0.38 mmol de site actif g^{-1} , voir matériels et méthodes du chapitre 2). Cette plus forte toxicité est en accord avec les caractéristiques délétères des NPG.

Si nous comparons maintenant les résultats de qPCR obtenus avec le protocole B, avec ceux du protocole A présentés dans la section précédente, pour les plus faibles concentrations en particules (1-4 $\mu\text{g L}^{-1}$), nous observons que les NPG induisent une induction de *p53* dans les branchies avec les deux protocoles et le facteur d'induction est similaire (≈ 4). Les PS-ref n'ont aucun point commun entre les deux expositions, car avec le protocole B il n'y a pas d'endocytose, pas de stress oxydant, pas de perturbation du métabolisme mitochondrial, ni d'apoptose ou de détoxification. Il est délicat de comparer les résultats des PSL-COOH car ce ne sont pas les mêmes particules dans les deux expositions. Dans le protocole A, il s'agit de latex du commerce de 200 nm contenant des surfactants et additifs, tandis que pour le protocole B, ce sont des latex de 340 nm synthétisés sans additifs. Néanmoins, les PSL-COOH du commerce induisent plus d'effets délétères que les PSL-COOH free soap dans les deux organes. Ceci pourrait être dû à la taille plus petite de ces particules et à la présence d'additifs potentiellement toxiques.

À la concentration de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, les NPG induisent de l'endocytose, une perturbation du métabolisme mitochondrial et des dommages à l'ADN dans les branchies avec les deux protocoles. Cependant, les gènes exprimés sont différents pour l'endocytose, avec l'induction de *cav* et *clt* pour le protocole B mais uniquement *cltc* pour le protocole A. De même *I2S* et *cox1* sont induits avec le protocole B mais seulement *I2S* pour le protocole A. Les facteurs d'induction sont un peu plus élevés pour le métabolisme mitochondrial avec le protocole B. Concernant les dommages à l'ADN, avec le protocole B les dégâts sont réparables, mais avec le protocole A il y a une induction de l'apoptose, suggérant des dommages irréversibles. Dans les masses viscérales, les effets communs concernent uniquement l'endocytose et la

détoxication cellulaire, dont les inductions sont plus fortes avec le protocole A. Nous pouvons noter qu'avec le protocole B, l'endocytose et la détoxication sont particulièrement actives avec des facteurs d'induction supérieurs au protocole A. Il y a également une perturbation du métabolisme mitochondrial dans les masses viscérales qui est absente avec le protocole A.

Dans l'ensemble, les NPG semblent induire plus d'effets avec le protocole B à la concentration de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ qu'avec le protocole A. Cependant il n'y a pas cet effet toxique important à la faible concentration observé avec le protocole A.

Il serait plus prudent de suggérer que les effets observés avec le protocole B sont en partie biaisés par le mauvais état de santé des huîtres, et il serait préférable de réitérer l'expérience dans de meilleures conditions pour pouvoir tirer des conclusions fiables.

Annexe VI : Caractéristiques des laser Flare 532 et Flare NX

	Flare 532-40-100	Flare NX 515 0,6-2
Longueur d'onde (nm)	532	515
Puissance moyenne (W)	0,04	0.615
Taux de répétition (Hz)	100	150 (ajustable jusqu'à 2000)
Energie par impulsion à 2000 Hz (μ J)	400	307.5
Largeur de pulse (ns)	2,0 \pm 0.5	1.24
Puissance crête (kW)	200	247.98
Diamètre du faisceau (mm)	0,45 \pm 0.05 (z = 4 cm)	347 μ m
Qualité de faisceau (M2) (TEM00)	<2	1.00
Symétrie du faisceau (%)	>85	>90
divergence 2 θ (mrad)	<1,6	1.88
Polarisation	>100:1 Horizontale	>100:1 verticale
Dimension de la tête laser (mm)	63x30x150	93.5x40x160
Dimension du driver laser (mm)	105x55x165	130x45x165

Annexe VII: Bases d'optique

I Caractéristiques d'un laser

I.1 Longueur d'onde

Les lasers n'émettent généralement qu'à une seule longueur d'onde. Dans notre étude nous nous intéressons aux longueurs d'ondes du visible entre 380 et 780 nm. Les lasers du Magellan sont des laser Nd :YAG dont la sélection de la longueur d'onde est permise par un cristal YAG dopé au Néodyme. Les photons émis sont dans la longueur d'onde de 1 064 nm (infra-rouges) dont la fréquence est doublée pour obtenir une longueur d'onde de 532 nm.

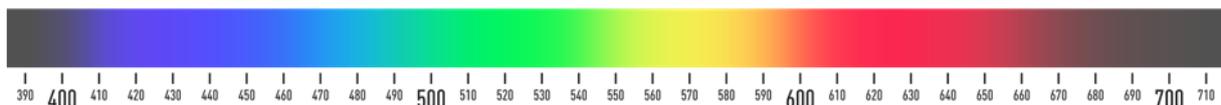


Figure 111 : spectre du visible

Cette longueur d'onde nous permet de calculer l'énergie d'un photon produit par le laser selon la relation de Planck-Einstein :

$$E = hv = \frac{c}{\lambda}$$

Avec

- C la vitesse de la lumière dans le vide $C = 2,99.10^8 \text{ m s}^{-1}$
- λ la longueur d'onde $\lambda = 532 \text{ nm}$
- h la constante de Planck $\approx 6,63.10^{-34} \text{ J s}$
- ν la fréquence du rayonnement électromagnétique.

L'énergie d'un photon à la longueur d'onde de 532 nm est de $hv = 2.3 \text{ eV}$. Les photons sont plus énergétiques à la longueur d'onde de 515 nm puisque $hv = 2.4 \text{ eV}$. Pour générer un plasma dans les longueurs d'onde du visible, l'énergie nécessaire pour libérer le premier électron se situe entre 6 et 10 eV. L'adsorption simultanée de plusieurs électrons est donc nécessaire pour atteindre l'énergie d'ionisation. Pour la plupart des matériaux 4 photons sont requis.

I.2 Puissance, durée d'impulsion et fréquence

Les lasers continus émettent des photons en continu et les lasers impulsionnels émettent des photons par intermittence selon des durée variable : nanoseconde, picoseconde, femtoseconde... Les lasers du Magellan sont des lasers nanosecondes dont la durée d'impulsion varie entre 1,2 et 2 ns.

La fréquence correspond au nombre d'impulsion laser par seconde et est exprimée en Hz

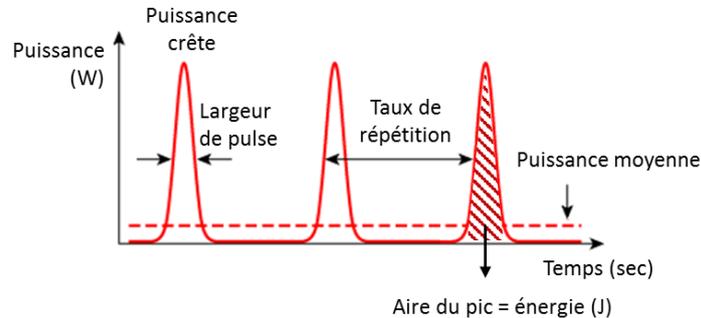


Figure 112 : schéma des impulsions laser

Puissance crête : C'est la puissance maximum atteinte pendant une impulsion. Plus la durée d'impulsion est faible plus la puissance crête est grande. Ainsi des lasers femtosecondes peuvent atteindre des puissances crêtes extrêmement élevées de 10 pW. En revanche un laser de soudage de puissance moyenne plus modeste de 1kW aura une puissance crête de 25kW. Les lasers du Magellan ont une puissance crête de l'ordre de 200 kW. L'énergie par impulsion est maximum à une fréquence optimale. Si l'on change la fréquence, l'énergie est amoindrie.

$$P_{\text{moyenne}} (\text{W}) = E (\text{J}) \times \text{Fréquence} (\text{Hz})$$

$$\text{Taux de répétition} (\text{Hz}^{-1}) = \frac{1}{\text{Fréquence} (\text{Hz})}$$

$$P_{\text{crête}} \text{ (W)} = \frac{E \text{ (J)}}{\text{Durée de pulse (s)}}$$

I.3 Intensité

Afin d'augmenter la densité d'énergie du faisceau laser, il est possible de focaliser le faisceau avec des lentilles pour diminuer son diamètre. On peut alors calculer l'intensité en W/cm^2 .

Après focalisation dans le Magellan, les lasers ont une intensité de l'ordre de $10^{12} \text{ W}/\text{cm}^2$. Pour comparaison les rayons du soleil focalisés avec une loupe produisent $100 \text{ W}/\text{cm}^2$, ce qui suffit pour enflammer une feuille de papier.

I.4 Faisceau Gaussien

Les lasers du Magellan ont des faisceaux dont l'intensité a une répartition gaussienne (Figure 113), et dont le mode est TEM 00 ce qui signifie que la forme du faisceau est circulaire (Figure 114). Un faisceau gaussien parfait est exempt de point chaud, c'est-à-dire exempt de zone avec une intensité anormalement élevée.

Le diamètre d'un faisceau gaussien se mesure au niveau de l'intensité égale à I_0/e^2 soit 13,5 % de l'intensité maximum (Figure 113). Elle peut également être mesurée à 50 % de l'intensité maximum (*Full width at half maximum*, FWHM)

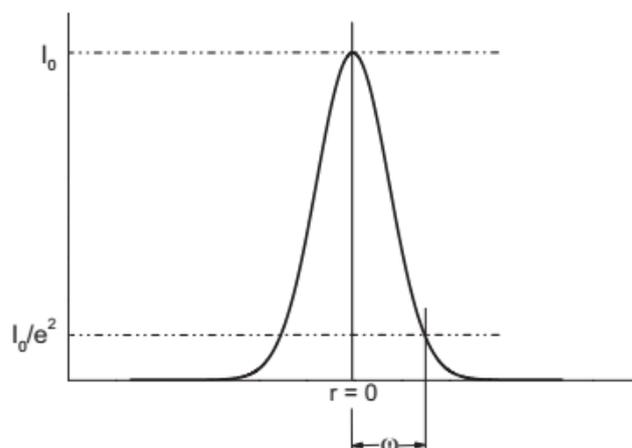


Figure 113 : Répartition radiale d'intensité d'un faisceau gaussien TEM 00 (Wagner et al., 2005).

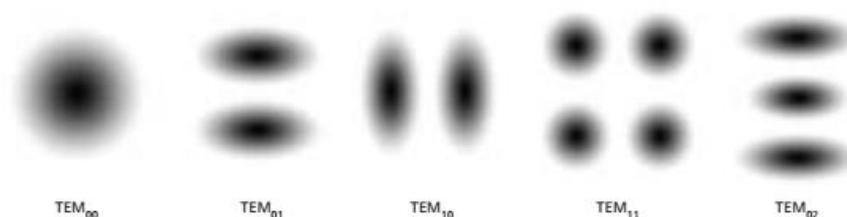


Figure 114 : Les différentes formes d'un faisceau gaussien.

I.5 Propagation du faisceau

Au cours de la propagation, le faisceau laser s'élargit transversalement, tandis que son amplitude sur l'axe diminue (conservation de l'énergie), mais avec un profil qui reste gaussien.

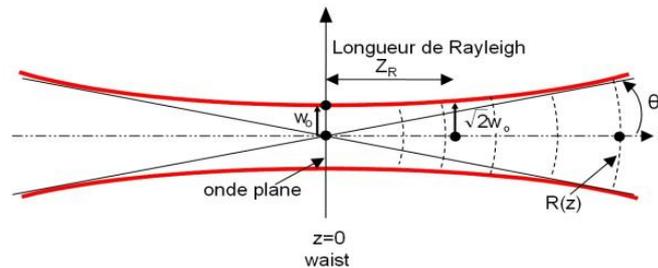


Figure 115 : schéma de propagation d'un faisceau gaussien

Le « waist » (w_0) désigne le la taille (rayon) minimale du faisceau avant que celui-ci diverge. La zone de Rayleigh est la zone dans laquelle le diamètre du faisceau est constant ($w_0 < w < w_0 \cdot \sqrt{2}$). Elle se calcule via la formule suivante :

$$Z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

Avec λ la longueur d'onde.

Les ondes lumineuses qui composent la lumière laser se propagent toutes dans la même direction, de manière parfaitement rectiligne. Un faisceau laser est très peu divergent, ce qui le rend visible sur de grandes distances. La divergence du faisceau (2θ) s'exprime en milli-radian. Concrètement, une divergence d'un milli-radian correspond à une augmentation du diamètre d'un millimètre sur un mètre de trajet. Le calcul du M^2 permet d'évaluer la propagation d'un faisceau gaussien. Il représente le rapport de la propagation réelle du faisceau sur la propagation théorique, avec w_{0r} et θ_r les waist et divergences réelles, et $w_{0\text{théo}}$ et $\theta_{\text{théo}}$ les waist et divergence théoriques. Pour un faisceau Gaussien parfait $M^2 = 1$.

$$M^2 = \frac{w_{0r} \theta_r}{w_{0\text{théo}} \theta_{\text{théo}}} \quad \text{et} \quad \theta = M^2 \frac{\lambda}{\pi w_0}$$

La formule suivante permet de déterminer le rayon du faisceau à une distance z du waist.

$$w(z) = w_0 \sqrt{\left(1 + \frac{z\lambda M^2}{\pi w_0^2}\right)^2}$$

I.6 Préchauffage et pointé laser

Lorsqu'un laser est mis en marche, le pointé du faisceau dévie de sa trajectoire pendant le préchauffage de la cavité. Il peut y avoir un déplacement latéral du faisceau, c'est ce qu'on appelle le dépointé latéral, et il peut y avoir une déviation angulaire, c'est ce qu'on appelle le dépointé angulaire.

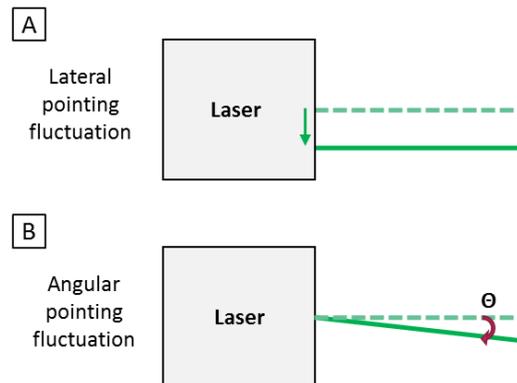


Figure 116 : schéma A. du dépointé latéral et B. du dépointé angulaire d'un laser

Il existe également un temps de préchauffage des éléments optiques. En effet quand le faisceau laser passe dans les éléments optiques tels que les lentilles, miroirs... ces derniers chauffent et se déforment avec la chaleur, jusqu'à atteindre une température et une forme stable.

I.7 Dimensions de la cavité

Les lasers avec des grosses cavités sont plus stables en énergie.

Un bon système de refroidissement permet également une meilleure stabilité du laser. Ce mode de refroidissement peut aller des simples ventilateurs combinés à des radiateurs jusqu'à des systèmes encombrants de refroidissement à eau plus efficaces.

II Outil optiques

Les Lentilles sont des éléments optiques transparents, le plus souvent en verre, qui permettent de faire diverger ou converger les rayons lumineux. Elles sont caractérisées par leur longueur focale f : distance à laquelle les rayons vont se croiser après être passés dans la lentille (dans le cas d'une lentille convergente). Le Magellan possède une lentille convergente pour focaliser le faisceau laser dans la cuvette de mesure.

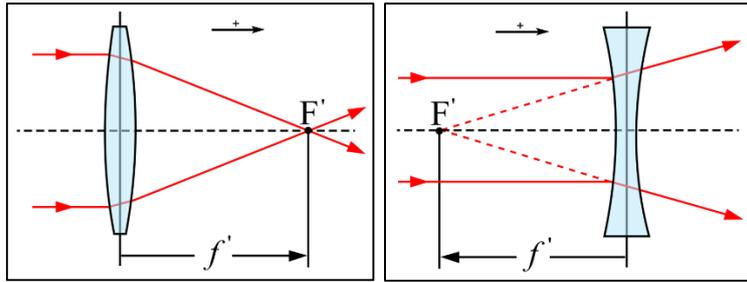


Figure 117 : schéma d'une lentille convergente à gauche et divergente à droite.

Le **Diaphragme à iris** est un élément mécanique interposé sur le trajet optique, il permet de faire varier la quantité de lumière transmise et le diamètre du faisceau en ouvrant ou fermant l'iris.

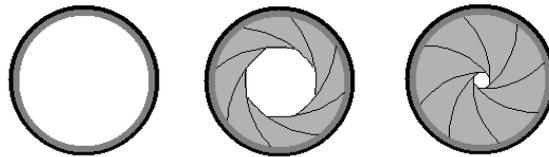


Figure 118 : schéma d'un diaphragme à iris a différentes ouvertures.

La **Camera CCD** est un capteur photographique qui permet de localiser le point d'impact d'un laser sur un écran récepteur.

L'**Atténuateur optique** est un élément qui permet de diminuer le signal optique émis par le laser. La diminution d'énergie du laser est rendu possible par la rotation des axes de polarisation de la lumière via une lame de retard demi-onde et la sélection d'un seul axe de polarisation grâce à un prisme de Glan (Figure 119 et Figure 120).

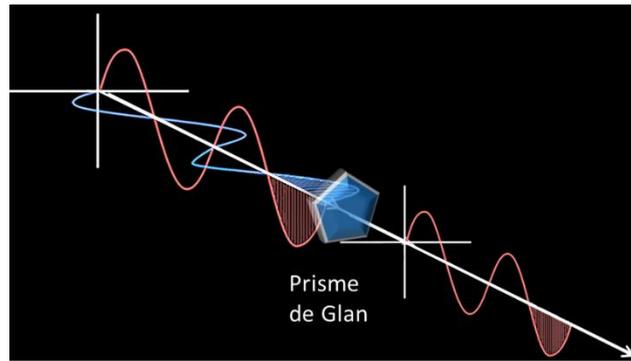


Figure 119 : schéma du fonctionnement d'un prisme de Glan

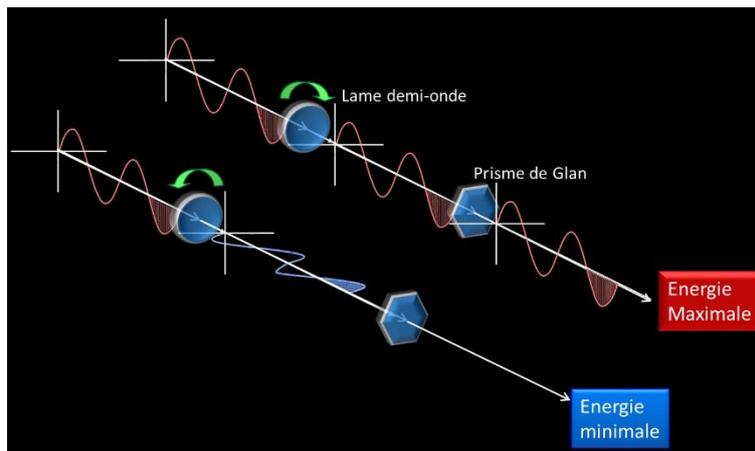


Figure 120 : schéma de fonctionnement d'un atténuateur optique composé d'une lame demi-
onde et d'un prisme de Glan.