



**HAL**  
open science

# Les additifs issus des microplastiques : caractérisation, lixiviation et impacts

Fleurine Akoueson

► **To cite this version:**

Fleurine Akoueson. Les additifs issus des microplastiques : caractérisation, lixiviation et impacts. Sciences agricoles. Université du Littoral Côte d'Opale, 2022. Français. NNT : 2022DUNK0641 . tel-04053373

**HAL Id: tel-04053373**

**<https://theses.hal.science/tel-04053373>**

Submitted on 31 Mar 2023

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

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



# Thèse de Doctorat de l'Université du Littoral Côte d'Opale

*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

*Mention Sciences agronomiques et écologiques  
Spécialité Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment*

Présentée par

**Fleurine Akoueson**

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

***Les additifs issus des microplastiques : caractérisation,  
lixiviation et impacts***

Soutenue le 07 Décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

**Stéphanie Reynaud, Directrice de Recherche, CNRS, IPREM**

**Pascal Wong Wah Chung, Professeur, Aix Marseille Université**

**Thierry Grard, Professeur des universités, ULCO**

**Camille Lacroix, Responsable de service déchets Aquatique, CEDRE**

**Guillaume Duflos, Directeur de Recherche, Anses**

**Alexandre Dehaut, Chargé de Projets Recherche, Anses**

**Ika Paul-Pont, Chargée de Recherche, CNRS**

**Rapportrice**

**Rapporteur**

**Président du jury**

**Examinatrice**

**Directeur de thèse**

**Membre invité**

**Membre invité**



1953



©The die line

2019



© Couverture de l'Obs, 2019

# Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier les financeurs qui m'ont permis d'effectuer ces trois années de thèse : l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) et la région Hauts-de-France. Ces travaux ont également été financés par le gouvernement français, l'IFREMER et la région Hauts-de-France dans le cadre du CPER MARCO 2015-2020 ainsi que par le GDR Polymères et Océans. Je remercie aussi Monsieur Laurent LALOUX, directeur du Laboratoire de sécurité des aliments (LSAI) de l'Anses de Boulogne-sur-Mer, pour avoir permis la réalisation de cette thèse au sein de ce département.



Je tiens ensuite à remercier les membres du jury ; Stéphanie REYNAUD, Pascal WONG WAH CHUNG, Camille LACROIX et Thierry GRARD ; pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je souhaite remercier tous les membres qui ont accepté de participer à mon comité de thèse (Alexandra TER HALLE, Thierry GRARD, Périne DOYEN, Ika PAUL-PONT, Alexandre DEHAUT et Guillaume DUFLOS). Ils ont apporté leur regard extérieur sur l'avancée de mes travaux ce qui a permis d'orienter la suite de mes réflexions et expérimentations. Merci à tous pour vos idées et réflexions enrichissantes et vos encouragements.

Je souhaite aussi remercier le LEMAR et tout particulièrement Ika et Kévin (ancien Lémarien) pour m'avoir accueillie dans votre équipe, m'avoir accompagnée et formée sur des expérimentations que je découvrais. Merci pour vos aides pour l'analyse des résultats, pour la rédaction des articles et pour avoir rendu mes séjours Bretons encore plus agréables ! Merci également à Arnaud HUVET, pour son implication dans mon sujet de thèse, dans les réunions, les manips et les corrections d'articles.

Je remercie aussi les membres du CEDRE, particulièrement Ronan, Justine et Camille, pour votre accueil toujours à bras ouvert. J'ai toujours une pointe de nostalgie quand je passe la porte du CEDRE et c'est à chaque fois un plaisir de travailler à vos côtés.



Au tour maintenant des piliers de cette thèse : mon directeur de thèse et mes encadrants. Un immense merci au duo de choc, Guillaume Duflos et Alexandre Dehaut, pour votre disponibilité, votre réactivité, votre écoute, votre positivité, votre bonne humeur, votre humour... j'ai pris beaucoup de plaisir à partager ces 3 années (et quelques mois) de thèse avec vous. Vos capacités d'analyses et vos nombreuses connaissances m'ont permis de progresser et ont répondu à plusieurs de mes préoccupations.

✧ Guillaume, je n'aurais pas pu espérer avoir un meilleur directeur de thèse. Je te remercie particulièrement pour tout le temps que tu m'as accordé, pour avoir partagé tes connaissances

avec moi et pour tes précieux conseils. Merci pour ta bonne humeur en toutes circonstances, ta bienveillance et ta confiance. Je me suis sentie solidement épaulée tout en ayant pu mener mes travaux avec beaucoup d'autonomie.

- ✧ Alexandre, merci pour ta disponibilité et tous nos moments d'échanges, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour avoir partagé tes connaissances et compétences avec moi et avoir usé de tes talents pour le codage statistique pour me conseiller à de nombreuses reprises. Je resterai toujours admirative de tes capacités d'organisation et de ta rigueur, qualités sur lesquelles je m'efforcerai de prendre exemple. (((Je n'oublie pas les quelques aligots que je te dois !)))
- ✧ Ika, même à distance la plupart du temps, merci pour ce super encadrement dont j'ai pu bénéficier. Merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur, tes conseils, ta hauteur d'esprit sur le sujet et tes remarques pertinentes qui m'ont souvent aidée à prendre du recul sur le sujet. Merci pour ton accueil durant plusieurs semaines, j'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés.
- ✧ Périne, je te remercie pour tes conseils avisés et pour l'intérêt que tu as porté à mes travaux en examinant avec attention chaque publication et ce mémoire. Je te remercie aussi pour tes nombreux encouragements.

Enfin, merci à tous pour la grande qualité de l'encadrement que j'ai pu recevoir tout au long de ces trois années, pour votre soutien constant, votre confiance et votre bienveillance. J'ai beaucoup appris à vos côtés, autant sur le plan professionnel que personnel. Vous avez énormément contribué à ce que ma thèse se déroule dans d'excellentes conditions (scientifiques comme personnelles).



Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude envers le personnel de l'Anses de Boulogne/Mer. Ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et tous les autres, pour les bons moments passés ensemble. Votre accueil chaleureux a beaucoup compté pour moi.

Je souhaite adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidée pendant ma thèse : Chaza CHBIB pour m'avoir mis sur les rails de la Py-GC-MS. J'ai énormément apprécié travailler en binôme avec toi durant les 6 premiers mois de ma thèse. Nos moments passés en dehors de l'Anses étaient aussi très précieux ; Margaux LAMIAUX pour avoir passé quelques échantillons pour moi pendant mon déplacement ; Charlotte HIMBER pour tes nombreuses aides techniques en Py-GC-MS. On aura partagé des moments de stress et de rage face aux caprices de Miss Orbitrap ; toute la team des poinçonneurs (des Lilas) : Charlotte, Margaux, Capucine, Marie-Ange, Simge, Pauline, Alexandre et Guillaume. Merci à tous pour avoir participé à une activité manuelle (très... enrichissante ☺), ce qui m'a permis de préparer dans les temps mes lixiviats pour le bon déroulement de mes manip ; Nicolina ANDERSSON pour ta relecture et tes corrections de l'une de mes publications en anglais.

A ma stagiaire, Armance BREMARD. Un grand merci pour le travail que tu as effectué et pour avoir mené tes travaux dans la bonne humeur, avec un enthousiasme et une motivation sans faille malgré quelques mésaventures 😊.

Aux autres doctorants du laboratoire ; Sylvain et Erwan pour le soutien mutuel, et Maureen et Julia pour avoir pu bénéficier de vos conseils de doctorantes expérimentées (maintenant Docteures !).

Enfin, à ceux avec qui nos liens nous mènent hors des sentiers de l'Anses : A Thomas, king of Corrèze. Merci pour ta joie de vivre, ton soutien, tes pop-corn, ton R.R, et tous les incroyables moments passés en ta compagnie. A Erwan pour ton soutien, ton humour et nos pauses St-Bernardus bien agréables. A Julia pour nos virées sur l'eau ou sur terre. A Roxane, pour ta bonne humeur et tes anecdotes. Et enfin, à Simge, pour ton soutien, ta bonne humeur, tes partages de musiques et nos escapades (qui ne font que commencer).



Je souhaite également adresser mes remerciements aux autres belles rencontres que j'ai pu faire au fil de cette thèse. Marie, Damien, Laura, Xavier, Valentin (...) merci à tous pour votre présence et tous les beaux moments passés à vos côtés.

Quelques mots pour remercier mes amis de longue date, en particulier Alice, Baptiste, Chloé, Meïna, Rim, et mes deux acolytes de Master Clara et Popo. Merci pour votre soutien constant, votre écoute et d'avoir supporté mes longs retards de réponses à vos messages. Oups. Enfin, merci d'être toujours présents malgré mes longues absences et les kilomètres qui nous séparent. Mes retours à vos côtés ont toujours été une grande source de bonheur et d'énergie.

Pour finir, un grand merci à mes parents. Je vous remercie pour votre soutien inconditionnel durant ces 3 années de thèse (et d'ailleurs depuis ces 27 années de vie !). Aussi, merci d'avoir relu ce manuscrit en un temps record à la recherche de la moindre faute d'orthographe.

Parents, amis, encadrants, merci. Mon expérience ici (dans le Nord !) n'aurait pas été la même sans vous.

# Sommaire

<b>Contributions scientifiques.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 : Etat de l'art.....</b>	<b>21</b>
<hr/>	
<b>1. Les matériaux plastiques.....</b>	<b>21</b>
1.1. Les polymères plastiques : production et utilisation .....	21
1.2. Les composés associés aux polymères.....	25
1.3. Les réglementations en vigueur pour les matériaux plastiques et les substances associées.	38
1.4. Une fin de vie problématique – gestion des déchets plastiques .....	43
<b>2. Les plastiques et microplastiques dans l'environnement.....</b>	<b>46</b>
2.1. La pollution plastique.....	46
2.2. Le devenir des déchets plastiques dans les océans.....	49
2.3. La lixiviation des additifs .....	56
2.4. La toxicité des additifs plastiques sur les organismes marins .....	67
<b>3. L'exposition de l'Homme aux MPs et additifs <i>via</i> la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture, et impacts sur la santé .....</b>	<b>70</b>
3.1. La production et la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture .....	70
3.2. L'exposition aux MPs <i>via</i> la consommation de produits de la mer .....	72
3.3. L'exposition de l'Homme aux additifs plastiques organiques .....	77



<b>4. Les méthodes d'extraction et de caractérisation des APOs.....</b>	<b>80</b>
4.1. Les méthodes indirectes – extraction par des solvants.....	81
4.2. Les méthodes directes.....	83
4.3. Identification et quantification des additifs plastiques en Pyrolyse-GC-MS.....	85
<b>Chapitre 2 : Identification d'additifs plastiques par Py/TD-GC-HRMS.....</b>	<b>110</b>
<hr/>	
<b>1. Préambule.....</b>	<b>110</b>
<b>2. Développement et application d'une méthode en Py/TD-GC-HRMS pour identifier les additifs plastiques organiques .....</b>	<b>111</b>
2.1. Identification d'additifs plastiques organiques : développement d'une méthode en Py/TD-GC-HRMS et application sur des packagings alimentaires .....	111
2.2. Résultats complémentaires : Application de la méthode analytique sur des échantillons en PE et en PP, dans le cadre d'une contribution dans une étude d'exposition de moules à des lixiviats de ces matériaux .....	135
<b>3. Contribution de ces travaux .....</b>	<b>138</b>
<b>Chapitre 3 : Lixiviation des additifs et études d'écotoxicités .....</b>	<b>142</b>
<hr/>	
<b>1. Préambule.....</b>	<b>142</b>
<b>2. Etude de la composition et de la toxicité de lixiviats de matériaux plastiques .....</b>	<b>144</b>
2.1. Présence et impacts d'additifs plastiques dans des contenants alimentaires en PP et PLA : complémentarité des analyses chimiques et des bioessais pour l'évaluation du risque.....	144
<b>3. Résultats complémentaires .....</b>	<b>167</b>
3.1. Objectif de l'étude complémentaire.....	167
3.2. Résultats et discussion.....	167
<b>4. Contribution de ces travaux .....</b>	<b>169</b>

<b>Chapitre 4 – Discussions et perspectives .....</b>	<b>172</b>
<hr/>	
<b>1. Analyse des additifs plastiques organiques.....</b>	<b>172</b>
1.1. La méthode .....	172
1.2. Les applications .....	175
<b>2. Lixiviation d'APOs de matériaux plastiques et évaluation de leur toxicité <i>in vitro</i> .....</b>	<b>177</b>
<b>3. Conclusion.....</b>	<b>182</b>
<b>Références.....</b>	<b>183</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>218</b>
<hr/>	
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>218</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>219</b>
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>232</b>



## **Contributions scientifiques**

### ❖ **Articles scientifiques :**

- **Akoueson Fleurine**, Ika Paul-Pont, Kévin Talleg, Arnaud Huvet, Périne Doyen, Alexandre Dehaut and Guillaume Duflos. 2022. " Additives in PP and PLA food packaging: chemical analysis and bioassays provide complementary tools for risk assessment" *Science of the Total Environment*.  
Doi : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159318>
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Armance Brémard, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut and Guillaume Duflos. 2022. " Identification of plastic additives: Py/TD-GC-HRMS method development and application on food containers." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.  
Doi : <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2022.105745>
- Uguen, Marine, Katy R. Nicastro, Gerardo I. Zardi, Sylvie M. Gaudron, Nicolas Spilmont, **Fleurine Akoueson**, Guillaume Duflos and Laurent Seuront. 2022. " Microplastic leachates disrupt the chemotactic and chemokinetic behaviours of an ecosystem engineer (*Mytilus edulis*)." *Chemosphere* 306: 135425.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135425> .
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2021. "Identification and quantification of plastic additives using Pyrolysis-GC/MS: a review." *Science of the Total Environment* 773: 145073.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145073> .

### ❖ **Communications orales :**

- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Sébastien Monchy, Armance Brémard, Arnaud Huvet, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2022. "Plastic additives in food packaging: characterization & impacts on the development stages of oyster (*Crassostera gigas*)." Polymère & Océan 2022, Brest (France), June 27 - 29<sup>th</sup>.
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Armance Brémard, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2022. "Pyrolysis-GC-HRMS: an application for the identification and quantification of organic plastic additives." SETAC Europe 32nd Annual Meeting, Copenhagen (Denmark), May, 15-19<sup>th</sup>.
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Armance Brémard, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2021. "Pyrolysis-GC-MS-Orbitrap: an application for the characterization of plastic additives." Marco 2021, Boulogne-sur-Mer (France), October, 14-15<sup>th</sup>.
- Dehaut Alexandre, Périne Doyen, Maria Kazour, **Fleurine Akoueson**, Jérémy Thery, Gabriel Pasquier, Thierry Grard, Rachid Amara, Luen-Luen Li, Sébastien Monchy, Sami Souissi, and Guillaume Duflos. 2021. "Implementation of the 3PAC platform: analysis and characterization of plastic particles in the environment and marine products." Marco 2021, Boulogne-sur-Mer (France), October, 14-15<sup>th</sup>.
- Duflos Guillaume, **Fleurine Akoueson**, and Alexandre Dehaut. 2021. "Microplastics in food: characterization of plastic additives using Pyrolysis-GC-MS-Orbitrap." AOAC Virtual Food Science Symposium, On-line Conference, August, 28<sup>th</sup> - September, 3<sup>rd</sup>.
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Sébastien Monchy, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2021. "GC/MS-Orbitrap: an application for the characterization of plastic additives." Polymère & Océan 2020, On-line Conference, February 8<sup>th</sup>.

- Dehaut Alexandre, **Fleurine Akoueson**, Ludovic Hermabessiere, and Guillaume Duflos. 2020. "Microplastics & Additives: inventory of impacts." Journée Perturbateurs Endocriniens, Paris (France), January 30<sup>th</sup>.

❖ **Communications affichées :**

- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2021. "Pyrolysis-GC-MS-orbitrap: an application for plastic additives characterization." SEFA Colloquium, On-line Conference, June 27-28<sup>th</sup>.
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2020. "Pyrolysis-GC-MS-orbitrap: an application for plastic additives characterization." Journées scientifiques et doctorales de l'ANSES (JSDA), Septembre 2021.
- **Akoueson Fleurine**, Chaza Chbib, Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont, Périne Doyen, Alexandre Dehaut, and Guillaume Duflos. 2020. "GC/MS-Orbitrap: an application for the characterization of organic plastic additives." Micro 2020, On-line Conference, November 23-27<sup>th</sup>

❖ **Autre contribution – sciences ouvertes :**

- Base de données sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International Akoueson Fleurine, Chbib Chaza, Dehaut Alexandre, & Duflos Guillaume. 2022. "Organic Plastic Additives High-Resolution Mass Spectra". Zenodo. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6599058>



# Liste des abréviations

## A

AGEC: Loi Anti-Gaspillage pour une Economie Circulaire, 43

APOs: Additifs plastiques organiques, 17

ATBC: Acétyl tributyl citrate, 27

## B

BBP: Benzyl Butyl Phtalate, 26

BHT: Hydroxytoluène butylé, 30

BPA: Bisphénol A, 29

BPB: Bisphénol B, 29

BPF: Bisphénol F, 29

BPS: Bisphénol S, 29

BTBPE: 1,2-Bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane, 28

## C

Cedre: Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux, 142

CMR: Cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques, 16

## D

DBP: Di-n-butylphthalate, 26

DCM: Dichlorométhane, 81

DEHA: Bis(2-ethylhexyl) adipate, 27

DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalate, 26

DIDP: Diisodecylphthalate, 26

DINCH: Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate, 27

DINP: Diisononylphthalate, 26

## E

ECHA: Agence européenne des produits chimiques, 30

EDM: Eau de mer, 137

EFSA: Autorité européenne de sécurité des aliments, 38

## G

GC: Chromatographie en phase gazeuse, 16

GC-MS: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, 81

## H

HAP: Hydrocarbures aromatiques polycycliques, 52

HBCD: Hexabromocyclododecane, 28

HOCS: Hazardous Organic Contaminants = Contaminant organiques dangereux, 53

HPLC: Chromatographie liquide haute performance, 81

HR: Haute résolution, 17

HRMS: Spectrométrie de masse haute-résolution, 110

## I

IR: Infrarouge, 83

## L

LC: Chromatographie liquide, 16

LEMAR: Laboratoire de l'environnement marin, 142

LOG: Laboratoire d'Océanologie d'océanologie et de Géosciences géosciences, 110

log Kow: Coefficient de partage octanol/eau, 57

## Liste des abréviations

### M

- m/m: masse/masse, 26
- MCDA: Matériaux plastiques en contact avec les denrées alimentaires, 15
- MeOH: Méthanol, 67
- MPs: Microplastiques, 15
- MS: Spectrométrie de masse, 16

### N

- NIAS: Substances non intentionnellement ajoutées, 30
- NPs: Nanoplastiques, 47

### O

- OPs: Octylphénols, 29

### P

- PBDEs: Polybrominated diphenyl ethers, 28
- PCB: Polychlorobiphényles, 52
- PE: Polyéthylène, 21
- PET: Poly(téréphtalate d'éthylène), 21
- pf: Poids frais, 73
- PHA: Polyhydroxyalcanoate, 23
- PHB: Polyhydroxybutyrate, 23
- PLA: Acide polylactique, 23
- PP: Polypropylène, 21
- PS: Polystyrène, 21
- PSE: Polystyrène expansé, 21
- PUR: Polyuréthane, 24

- PVC: Polychlorure de vinyle, 21
- Py: Pyrolyse, 16
- Py/TD: Désorption thermique par un pyrolyseur, 85
- Py-GC-MS: Pyrolyse couplée à une chromatographie gazeuse suivie d'un spectromètre de masse, 85

### R

- REACH: Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques, 29
- RFB: Retardateurs de flammes bromés, 28
- RFP: Retardateurs de flammes phosphorés, 28
- RMN: Résonance magnétique nucléaire, 83
- rpm: Rotations par minute, 60

### S

- SBSE: Extraction par sorption sur barreau magnétique, 142
- STEP: Station d'épuration, 46

### T

- TBBPA: Tétrabromobisphénol A, 26
- TCEP: Tris(2-chloroethyl)phosphate, 28
- TCP: Tricresylphosphate, 28
- TD: Thermo-désorption ou désorption thermique, 83
- TDCPP: Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate, 28
- TPhP: Triphenyl phosphate, 28

### U

- UE: Union Européenne, 24
- UV: Ultra-violet, 83





## **Liste des figures**

Figure 1 : Vue d'ensemble des plastiques biosourcés et pétrosourcés ainsi que leur caractère de dégradabilité (adapté de Geueke., 2014). .....	22
Figure 2 : Sources et transport des déchets plastiques vers l'océan. (Adapté de Marine litter vital graphics 2016© Maphoto/Ricardo Pravettoni. Accessible sur : <a href="https://www.grida.no/resources/6922">https://www.grida.no/resources/6922</a> <a href="https://www.grida.no/resources/6922">https://www.grida.no/resources/6922</a> ).....	46
Figure 3 : Exemples des différentes catégorisations des débris plastiques en fonction de leur taille, définies dans la littérature. Il convient de noter qu'il ne s'agit pas d'un aperçu exhaustif de toutes les classes de taille utilisées. (Issu de Hartmann et al., 2019).....	48
Figure 4 : Devenir des déchets plastiques dans le milieu marin. (Adapté de Marine litter vital graphics © Maphoto/Ricardo Pravettoni. Accessible sur : <a href="https://www.grida.no/resources/6911">https://www.grida.no/resources/6911</a> ).....	49
Figure 5 : Evolution de la production, de l'utilisation et de la consommation mondiale halieutique et aquacole de 1950 à 2020 (en millions de tonnes). D'après FAO., 2022. ....	71
Figure 6 : Estimation de la consommation moyenne de poisson par personne et par an (moyenne entre 2015 et 2019). D'après FAO., 2022.....	71
Figure 7 : Produits de la pêche et de l'aquaculture les plus achetés par les Français en 2020. D'après FranceAgriMer., 2022.....	72
Figure 8 : Schéma de synthèse de l'objectif et de la démarche expérimentale de l'étude présentée dans l'article 2 relative à la mise en place d'une méthode d'identification d'additifs plastiques organiques (APOs) en Py/TD-GC-HRMS et à son application sur des échantillons de barquettes alimentaires en polypropylène (PP) et en acide polylactique (PLA).....	112
Figure 9 : Aires (en unité arbitraires (U.A)) des additifs plastiques organiques (APOs), (A) plastifiants, (B) retardateurs de flamme, et (C) antioxydants, identifiés dans les deux échantillons de PE (gris) et de PP (noir), après l'analyse de particules de $500 \mu\text{m}^2 (\pm 16 \mu\text{m}^2)$ (n=3). * : différence significative entre les échantillons de PE et de PP (Test T de Student, $p < 0,05$ ). ....	136
Figure 10 : Schéma de synthèse de la démarche expérimentale de l'étude présentée dans l'article 4 relative à l'étude des profils chimiques et écotoxicologiques des matériaux et lixiviats d'échantillons de barquettes alimentaires en polypropylène (PP) et acide polylactique (PLA). MeOH= méthanol; EDM= eau de mer. ....	145
Figure 11 : Présence/absence des additifs plastiques dans les barquettes alimentaires en PP et PLA, via (A) une analyse par SBSE-TD-GC/MS des extraits de méthanol et (B) une analyse par Py/TD-GC-HRMS des matériaux bruts.....	167



## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Les principaux types de thermoplastiques produits et leurs caractéristiques.....	21
Tableau 2 : Additifs plastiques organiques les plus communément utilisés.....	32
Tableau 3 : Exemple de données de toxicité (non exhaustif) pour les additifs plastiques organiques majoritaires .....	36
Tableau 4 : Mesures et réglementations pour certains additifs plastiques organiques majoritairement utilisés.....	42
Tableau 5 : Méthodes et paramètres utilisés pour la préparation de lixiviats dans les études écotoxicités.....	64
Tableau 6 : Etudes sur la toxicité et écotoxicité de lixiviats de polymères plastiques sur les organismes marins et aquatiques .....	69
Tableau 7 : Principaux facteurs influençant et expliquant la complexité de l'analyse des additifs plastiques (Crecely and Day, 1998; Hahladakis et al., 2018; Subramanian, 2013).....	80
Tableau 8 : Liste d'exigences pour une méthode d'extraction idéale (issus de Bart et al., 2005) .....	82
Tableau 9 : Avantages et limites communs aux analyses spectroscopiques IR, UV et Raman. (Bart, 2006; Crecely and Day, 1998).....	83



## **Introduction**

Depuis les années 1950, la production et l'utilisation de plastique n'ont cessé d'augmenter. En 2020, la production était estimée à 367 millions de tonnes à l'échelle mondiale (PlasticEurope, 2021). Actuellement, une grande partie des plastiques produits se retrouve dans l'environnement notamment dans le milieu marin. En effet, la majorité des déchets plastiques est acheminée depuis les bassins versants le long du continuum terre-mer jusqu'aux océans qui constituent le réceptacle final de toutes les pollutions anthropiques. Chaque année, jusqu'à 31,9 millions de tonnes de débris plastiques de toutes tailles, macroplastiques (>25mm), mésoplastiques (5-25mm) et microplastiques (< 5mm), sont déversées dans les océans (Nelms et al., 2021). Les sources, le devenir et les effets de cette pollution plastique sont étudiés depuis les années 1970 (Kenyon and Kridler, 1969). Les nombreuses études menées jusqu'à présent permettent d'affirmer que la présence de plastique et de microplastiques (MPs) dans l'environnement est maintenant ubiquitaire et est devenue au fil du temps un sujet important des préoccupations environnementales et sanitaires.

La pollution plastique et les dangers qui lui sont associés sont une menace pour l'environnement et les organismes (Galloway, 2015). Au-delà de l'impact « physique » lié à l'ingestion de microparticules de plastique, entraînant entre autres une perturbation des processus digestifs (Galloway, 2015; Sussarellu et al., 2016; Tallec et al., 2018), un autre aspect de la problématique des MPs, moins étudié, est leur impact « chimique », lié notamment à la présence et au relargage d'additifs plastiques (Bucci et al., 2020). Les additifs plastiques sont des molécules chimiques ajoutées aux polymères dans leur formulation afin de leur octroyer diverses propriétés désirées (Hahladakis et al., 2018). Il existe une grande diversité d'additifs, comme les plastifiants, les retardateurs de flamme, les antioxydants, les stabilisateurs, les pigments et les colorants (Hahladakis et al., 2018). La majorité des additifs plastiques ne sont pas liés chimiquement à la matrice polymérique et peuvent migrer en dehors du plastique vers le milieu environnant. Ce phénomène est préoccupant dans le cadre des matériaux plastiques en contact avec les denrées alimentaires (MCDA) avec une migration possible vers les aliments (Hahladakis et al., 2018), mais aussi dans l'eau de mer ou dans le biote après ingestion de MPs (Al-Odaini et al., 2015; Capolupo et al., 2020; Koelmans et al., 2016; Tanaka et al., 2015). Au-delà de ces matériaux pour lesquels il existe une réglementation, l'Homme est exposé directement ou indirectement à une diversité de matériaux plastiques par contact, ingestion ou respiration. (European Commission, 2011a). Par ailleurs, aucune norme n'existe et très peu d'informations sont disponibles sur le transfert et la toxicité de ces matériaux une fois à l'état de déchet dans l'environnement ou après ingestion par des organismes marins. De plus, du fait de la présence de MPs et d'additifs dans des produits de la pêche et de l'aquaculture (EFSA, 2016; Hermabessiere et al., 2017; Rochman, 2015), des questions se posent sur l'exposition de l'Homme face à ces molécules d'additifs, via la consommation de ces produits particulièrement exposés à une potentielle contamination. De ce fait, l'analyse de ces additifs plastiques suscite de plus en plus d'intérêt notamment depuis que

l'utilisation de certains d'entre eux (*e.g.* phtalates, bisphénols, retardateurs de flamme bromés etc.) est devenue controversée après la mise en évidence de leurs toxicités pour l'environnement, les organismes et la santé humaine (Yanagisawa et al., 2018). Cette controverse provient notamment du fait de leur capacité à être bioaccumulés, leurs rôles de perturbateurs endocriniens et leurs activités cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR) (Groh et al., 2019; Yang et al., 2021). Les additifs pourraient même revêtir un rôle prépondérant dans la toxicité des plastiques et des MPs par rapport à l'ingestion de la particule en elle-même (Beiras et al., 2021). Plusieurs études ont mis en évidence le transfert et la toxicité des additifs sur divers organismes marins par des expériences de lixiviation de plastique dans de l'eau de mer (Browne et al., 2013; Gardon et al., 2020; Koelmans et al., 2014; Rochman, 2015; K. Tallec et al., 2022). Cependant, il est compliqué de relier la toxicité observée à la nature des additifs et peu d'études sont parvenues à identifier les molécules d'additifs présentes dans les lixiviats du fait du manque de base de données, d'une mauvaise connaissance des structures des molécules ou de la complexité des signaux spectraux obtenus (Bejgarn et al., 2015; von Eyken et al., 2020; Zimmermann et al., 2021; Zimmermann et al., 2020b). En effet, les données disponibles concernant la diversité des molécules utilisées et les quantités ajoutées aux matériaux plastiques sont insuffisantes, notamment à cause de l'absence de transparence de la part des fabricants qui ne sont pas tenus de divulguer publiquement la composition chimique exacte de leurs produits. Afin de mieux appréhender et estimer l'exposition des organismes marins ainsi que des consommateurs aux additifs plastiques, il apparaît urgent et nécessaire de développer des méthodes d'analyses robustes pour les identifier et les quantifier. L'analyse des additifs plastiques et des polymères est un challenge pour diverses raisons qui seront exposées dans ce manuscrit. Historiquement, l'analyse des additifs a été réalisée par des analyses en chromatographie gazeuse ou liquide couplées à un spectromètre de masse (GC-MS ou LC-MS). Ces techniques analytiques sont le plus souvent précédées par une extraction chimique au solvant comprenant des étapes de préparation des échantillons nombreuses, complexes et chronophages (Kim et al., 2016; Kudo et al., 2019; Trimpin et al., 2009). Depuis ces dernières années, l'utilisation de la pyrolyse couplée à une chromatographie gazeuse suivie d'un spectromètre de masse (Py-GC-MS) a gagné de l'intérêt. Cette méthode est utilisée pour caractériser la composition chimique et la structure des composés volatils mais aussi non volatils (Fries et al., 2013; Riess et al., 2000; Tsuge et al., 2011). Elle offre un avantage quant à l'analyse d'échantillons complexes, tels que les matrices polymériques, en permettant d'analyser indépendamment et successivement les additifs plastiques de faible poids moléculaire puis de caractériser la matrice polymérique de poids moléculaire élevé (Herrera et al., 2003; Okoffo et al., 2020).

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à explorer et apporter des éléments sur les additifs organiques associés aux MPs en lien avec les phénomènes de lixiviation et leurs impacts sur les

organismes marins par des approches et outils complémentaires à la fois analytiques et écotoxicologiques. Avec pour objectif, *in fine* d'apporter une aide dans l'évaluation des dangers des additifs plastiques pour les organismes marins et l'Homme. Ces travaux sont menés sur des plastiques dits conventionnels (*i.e.* pétrosourcés) mais aussi sur des alternatives biosourcées, c'est-à-dire élaborés à partir de ressources renouvelables (*e.g.* amidon, algues) et biodégradables et/ou compostables sous certaines conditions (Geueke, 2014; Karamanlioglu et al., 2017).

Le premier chapitre (**Chapitre 1**) de ce mémoire présente une synthèse bibliographique séparée en quatre grandes parties. La première traitera des matières plastiques de leur conception jusqu'à leur fin de vie en abordant les additifs associés aux plastiques qui seront au cœur de chaque étude dans ce travail de recherche. La deuxième partie abordera la pollution plastique et le devenir des déchets dans l'environnement marin, avec un focus sur la présence et l'impact des additifs plastiques dans le milieu et les organismes marins. La troisième partie s'intéressera à l'exposition de l'Homme à ces additifs *via* la consommation de produits de la pêche. La dernière partie présentera les différentes techniques analytiques permettant l'étude des additifs plastiques organiques (APOs), en se focalisant sur la technique de Py-GC-MS qui est la technique choisie pour ce travail de thèse. Ce dernier point à fait l'objet d'une publication dans le journal *Science of the Total Environment*.

Les chapitres qui suivent présenteront les différentes expérimentations et les principaux résultats issus de ces travaux de thèse. Ainsi, le **Chapitre 2** présentera la mise en place d'une méthode analytique en Py/TD-GC-MS haute résolution (HR) pour l'identification d'additifs plastiques organiques, ainsi qu'à son application sur divers échantillons. Ce chapitre fait l'objet d'un article publié dans le *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.

Dans le troisième chapitre (**Chapitre 3**), la toxicité des additifs sera évaluée par l'exposition d'organismes marins aux lixiviats de matériaux plastiques suivie par trois bioessais qui étudieront l'impact des lixiviats sur les jeunes stades de vie (gamètes et embryons) de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), ainsi que l'inhibition de la bioluminescence de *Aliivibrio fischeri*, *via* la réalisation de tests Microtox®. Cette évaluation sera complétée par la caractérisation chimique des lixiviats en ciblant certains APOs. Ce chapitre fait l'objet d'un article publié dans le journal *Science of the Total Environment*.

Pour terminer, le **Chapitre 4** proposera une discussion des résultats obtenus tout en esquissant des perspectives pour les futures recherches.





# **CHAPITRE 1**

---

## **Etat de l'art**

### Plastiques et additifs



# Chapitre 1 : Etat de l'art

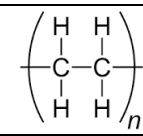
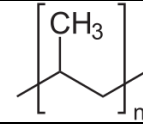
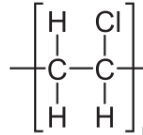
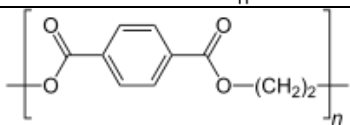
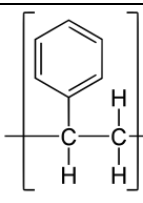
## 1. Les matériaux plastiques

### 1.1. Les polymères plastiques : production et utilisation

#### 1.1.1. Les types de polymères

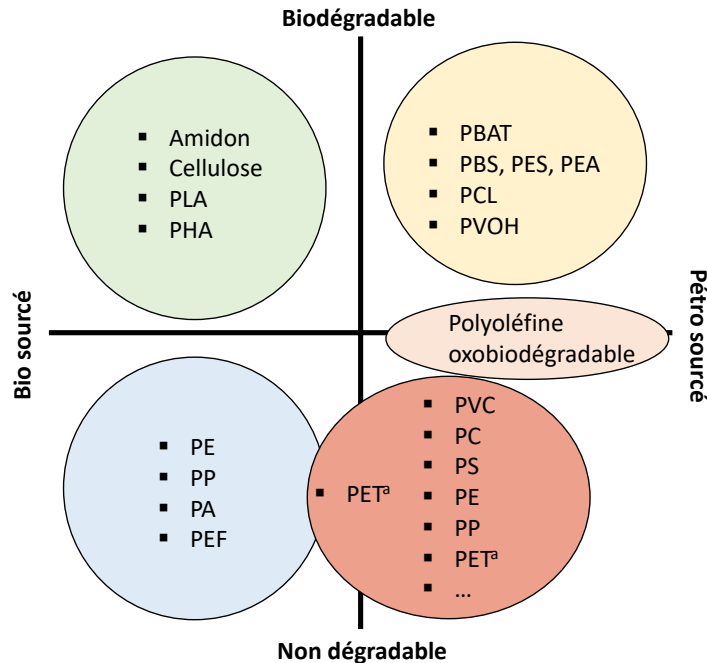
Les matériaux plastiques sont des polymères formés à partir de monomères liés entre eux par des liaisons covalentes (GESAMP, 2015). Les polymères d'origine fossile comportent trois grandes familles de plastiques : les thermodurcissables, les thermoplastiques et les élastomères. Les thermodurcissables sont formés à très haute température avec des modifications chimiques et possèdent de fortes liaisons covalentes. Ces plastiques ne sont plus malléables après leur polymérisation (*e.g.* polyépoxydes et polyuréthanes). Les élastomères sont quant à eux des polymères très élastiques et flexibles (*e.g.* le caoutchouc et le silicone). Les thermoplastiques sont des plastiques possédant l'avantage d'être toujours malléables après leur moulage sous l'effet de la température (Bîrcă et al., 2019). Les thermoplastiques représentent 90% de la production française de plastiques avec principalement le polyéthylène (PE) (basse densité et haute densité), le polypropylène (PP) et le polychlorure de vinyle (PVC), suivis par le poly(téréphtalate d'éthylène) (PET), le polystyrène (PS) et le polystyrène expansé (PSE) (PlasticEurope, 2020) (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Les principaux types de thermoplastiques produits et leurs caractéristiques**

Polymères	Densité	Formule	Monomère
PE	0,90 - 0,97	$(C_2H_4)_n$	
PP	0,83 - 0,90	$(C_3H_6)_n$	
PVC	1,38 - 1,4	$(C_2H_3Cl)_n$	
PET	1,34 - 1,37	$(C_{10}H_8O_4)_n$	
PS	1,04 - 1,05	$(C_8H_8)_n$	

PE : polyéthylène (haute et basse densité) ; PP : polypropylène ; PVC : polychlorure de vinyle ; PET : poly(téréphtalate d'éthylène) ; PS : polystyrène.

Par ailleurs depuis les quinze dernières années, l'intérêt pour la production et l'utilisation des bioplastiques<sup>1</sup>, notamment pour des applications de packaging alimentaire, prend de l'ampleur. Il existe deux grandes catégories de bioplastiques : les polymères biosourcés<sup>2</sup> et les polymères biodégradables<sup>3</sup> (**Figure 1**).



**Figure 1 : Vue d'ensemble des plastiques biosourcés et pétrosourcés ainsi que leur caractère de dégradabilité (adapté de Geueke., 2014).**

PLA : acide polylactique; PHA : polyhydroxyalkanoates; PBAT : polybutylène adipate téréphtalate ; PBS : polybutylène succinate; PES : polyéthylène succinate ; PEA : polyéthylène adipate; PCL : Polycaprolactone; PVOH : alcool polyvinyle ; PE : polyéthylène ; PP : polypropylène, PA : polyamides ; PEF : polyéthylène furanoate ; PVC : Polychlorure de vinyle ; PC : polycarbonate ; PS : polystyrène.

<sup>a</sup> : le PET est généralement synthétisé à partir de matières premières fossiles, mais jusqu'à 30% de matières premières biosourcées peuvent être incluses dans la production.

Les polymères biosourcés sont formés à partir de biomasse renouvelable mais ne sont pas forcément biodégradables, et les polymères biodégradables, en revanche, peuvent être issus de ressources naturelles ou pétrochimiques (Geueke, 2014). Ainsi, biosourcé ne signifie pas nécessairement biodégradable, et réciproquement. Ces matériaux biosourcés peuvent être

<sup>1</sup> En l'absence de définition officielle, un bioplastique est un plastique biosourcé et/ou biodegradable (European Bioplastics, 2018). En France, un bioplastique est défini comme biosourcé ET biodegradable. En Angleterre, il est défini comme biosourcé ET/OU biodégradable (JORF n°0297 - (Journal officiel, 2016)).

<sup>2</sup> Biosourcé : se dit d'un produit ou d'un matériau entièrement ou partiellement fabriqué à partir de matières d'origine biologique (Journal officiel, 2016).

<sup>3</sup> La biodégradabilité désigne l'aptitude d'un matériau à être complètement dégradé et minéralisée par l'action de micro-organismes. Ce mécanisme peut se produire soit en présence d'oxygène (*i.e.* aérobie) avec une conversion des matériaux en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux, suivi par l'apparition et/ou réorganisation d'une nouvelle biomasse ; soit en l'absence d'oxygène (*i.e.* anaérobie) avec une conversion en dioxyde de carbone, méthane, sels minéraux et biomasse (European Bioplastics, 2018; Journal officiel, 2016).

(i) directement issus de la biomasse (comme l'amidon et la cellulose), (ii) produits par des microorganismes (comme les polyhydroxyalkanoates (PHA) et polyhydroxybutyrates (PHB)), (iii) produits par synthèse chimique en utilisant des monomères naturels (comme l'acide polylactique (PLA)), ou encore (iv) partiellement biosourcés, en utilisant un mélange de monomère bio- et pétrosourcés, comme dans le cas de certains PE ou PET biosourcés (European Bioplastics, 2016; Geueke, 2014).

Les polymères biosourcés peuvent remplacer les plastiques dits « conventionnels » dans de diverses applications car ils miment la plupart de leurs propriétés (Yadav et al., 2018). Cependant, ces polymères ne sont pas aussi performants que les plastiques conventionnels, notamment dans le domaine de l'emballage alimentaire où différentes limites sont observées concernant leur résistance à la chaleur, leur fragilité et leurs propriétés mécaniques, ainsi que les propriétés de perméabilité aux gaz et en particulier à l'oxygène (Bozec, 2010; Rhim et al., 2009). De plus, il convient de considérer le caractère de biodégradabilité avec prudence. La biodégradabilité et la compostabilité<sup>4</sup> des plastiques sont dépendantes du milieu de fin de vie de ces déchets et sont définies par des standards. Leur mise en œuvre est bien encadrée selon différentes normes : NF EN 13432, NF EN 14995 et ISO 17088 pour la capacité de biodégradation en composts industriels, et NT T51-800 : 2015 et EN 17427 : 2020, pour la France et l'Europe respectivement, concernant les composts domestiques (Emballages magazines et al., 2019; Lapointe, 2012). En effet, ces terminologies (bioplastiques, biosourcés, biodégradables et compostables) portent souvent à confusion. Si certains bioplastiques sont considérés comme biodégradables ou compostables, ils le sont uniquement sous certaines conditions (de températures, d'humidité et d'oxygénation) qui ne seront atteintes que dans des installations industrielles ou municipales (*e.g.* des températures de l'ordre de 50 à 60°C) ou des environnements précis (*e.g.* sols pour les films de paillage agricole) (Emballages magazines et al., 2019). Des normes de spécification permettant la certification des plastiques biodégradables existent pour les composts industriels, municipaux, domestiques et les sols (exclusivement pour les films de paillage agricole ou horticole), a contrario des milieux eau douce et eau de mer, et des milieux anaérobies, pour lesquels aucune norme n'existe. Pour ces milieux environnementaux, seules des normes méthodologiques et expérimentales existent mais ne permettent pas d'attester leur dégradabilité et leur innocuité. Dans le cas où les plastiques biodégradables seraient relargués dans l'environnement, ils ne pourraient alors pas être

---

<sup>4</sup> Compostabilité : désigne l'aptitude d'un matériau à se biodégrader entièrement dans un processus de compostage, en présence de déchets organiques et dans des conditions particulières (montée en température, présence de micro-organismes spécifiques, etc.). Il existe différentes normes permettant de qualifier les plastiques de "compostables" : les normes NF EN 13432 et NF EN 14995 qui désignent les emballages et les plastiques capables de se dégrader en condition de compostage industriel, et les normes AS5810 : 2010, NF T51-800 : 2015, prEN 17427 : 2020 concernant les plastiques aptes au compostage domestique (Zero Waste France, 2020).

dégradés et conserveraient une stabilité et une toxicité à l'image des autres polymères pétrosourcés (Karamanlioglu et al., 2017).

### 1.1.2. La ruée vers le plastique - production et utilisation

La production industrielle de plastique a réellement commencé à se développer vers 1950, où la production mondiale était alors de 2 millions de tonnes/an (Geyer et al., 2017). Depuis, la production de plastique n'a cessé d'augmenter pour répondre à la demande croissante de notre société (Gilbert, 2017). La production annuelle mondiale de plastique est aujourd'hui estimée à 367 millions de tonnes (hormis les fibres synthétiques) (PlasticEurope, 2021) et à 122 millions de tonnes pour les fibres synthétiques, (NOAA Marine Debris Program, 2022) et toujours en croissance continue, hormis pendant les périodes de crises (*e.g.* le choc pétrolier de 1973, la crise financière de 2008 et la crise sanitaire de 2020). En Europe (Union européenne (UE) avec la Norvège et la Suisse), la production est d'environ 50 millions de tonnes (Pagev, 2016). Sur ce total, la répartition de la consommation par type de plastique est la suivante : PE (haute et basse densité) (30,3%), PP (19,7%), PVC (9,6%), PET (8,4%), Polyuréthane (PUR) (7,8%), PS et PSE (6,1%) et autres (18,1%) (PlasticEurope, 2021). La production de plastiques biosourcés (tous caractères de biodégradabilité confondus) n'a représenté quant à elle que 2,4 millions de tonnes en 2021, ce qui est très peu en comparaison avec celle des polymères pétrosourcés (<1%). Elle est néanmoins en constante augmentation et devrait atteindre 7,59 millions de tonnes en 2026 (European Bioplastics, 2016). Le PLA, fabriqué à près de 0,5 tonne à l'échelle européenne (European Bioplastics, 2016), représente actuellement le plus gros volume de production parmi les bioplastiques. Il est notamment utilisé en tant que MCDA et remplace à large échelle le PE, le PET et le PS (Jabeen et al., 2015; Ncube et al., 2020).

Les matériaux plastiques possèdent de multiples avantages : malléabilité, versatilité, résistance, faible densité, facilité de fabrication avec des procédés bien maîtrisés, optimisés et automatisés permettant des cadences de production élevées et une réduction des coûts de production. Ces caractéristiques expliquent la forte demande pour ces matériaux. Aujourd'hui, d'après la base de données CAMPUS® (Chemie Wirtschaftsförderungs - GmbH, 2022), plus de 5 300 formulations de polymères sont disponibles dans le commerce. Près de 40% des plastiques produits sont destinés à l'emballage, 20% à la construction, 10% à l'automobile, 6% à l'électronique et 3% à l'agriculture. Les 21% restant concernent le secteur de la médecine, de l'ameublement, des sports et loisirs et des objets domestiques (Plastic Europe, 2019).

Dans certains secteurs, notamment celui de l'emballage alimentaire, les matériaux doivent répondre à des cahiers des charges complexes comme la résistance mécanique, les propriétés barrière aux gaz, la résistance à la vapeur d'eau, aux UVs, des critères de brillance ou de transparence (*e.g.* films alimentaires). Un matériau unique ne peut pas assurer à lui seul toutes les fonctions désirées pour une application. De ce fait, certaines barquettes alimentaires sont composées de plusieurs polymères ou

sont recouvertes de films contenant plusieurs couches de polymères différents pouvant aller jusqu'à une dizaine de couches sur une épaisseur très faible de l'ordre de quelques micromètres ( $\mu\text{m}$ ) (Bozec, 2010). La composition de tels matériaux est dès lors très complexe en ce qui concerne les polymères et les substances chimiques qui leur sont associées.

## 1.2. Les composés associés aux polymères

Comme évoqué précédemment il existe un nombre important de polymères destinés à diverses applications. Afin de répondre à tous les besoins, bien souvent spécifiques, les polymères sont nécessairement associés à une grande variété de composés chimiques : les additifs, les aides à la transformation, les charges et les renforts.

- (i) Les additifs, permettent de modifier les caractéristiques physico-chimiques des polymères en leur conférant certaines propriétés et en améliorant leurs performances. (Hahladakis et al., 2018; Murphy, 2001) (Cf. partie 1.2.1).
- (ii) Les aides à la transformation, *i.e.* catalyseurs de polymérisation, les solvants ou lubrifiants, permettent de faciliter leur production.
- (iii) Les charges, comprenant des substances comme l'argile, le talc ou les carbonates, visent à améliorer les propriétés de revêtement des polymères. Elles sont ajoutées à hauteur de 50% de la masse du plastique, *i.e.* 50% masse/masse (m/m) (Hansen et al., 2013).
- (iv) Les renforts, comprenant les fibres synthétiques, sont utilisés pour augmenter la résistance mécanique des produits et sont typiquement ajoutés entre 15 et 30% m/m (Hansen et al., 2013).

Au total, plus de 10 000 substances chimiques seraient utilisées et incluses dans les plastiques, dont plus de 55% (*i.e.* > 5 800) sont utilisées en tant qu'additifs plastiques (Wiesinger et al., 2021), substances sur lesquelles s'est focalisé ce travail de thèse.

### 1.2.1. Les additifs plastiques

Les additifs plastiques sont des composés chimiques incorporés aux polymères durant leur formulation, essentiels à leur fabrication, pour maintenir, améliorer et leur conférer des propriétés particulières ou encore atténuer des propriétés indésirables (Hahladakis et al., 2018; Murphy, 2001; OCDE, 2004). Les familles d'additifs les plus produits et majoritairement inclus dans les plastiques, sont les plastifiants, les retardateurs de flamme, les antioxydants, les stabilisants et les pigments. Ils peuvent être de nature inorganique, comme les métaux (*e.g.* le zinc utilisé comme pigment ou antioxydants, et le dioxyde de titane employé comme stabilisateur UVs), ou de nature organique (présentés plus en détails ci-dessous) (Fries et al., 2013; Hahladakis et al., 2018; Ranjan et al., 2021). Les APOs ne sont en général pas liés chimiquement aux polymères, à l'exception du



tétrabromobisphénol A (TBBPA). Ils ont donc la capacité de migrer du plastique vers le milieu environnant, durant le phénomène de lixiviation, d'autant plus quand le matériau se dégrade (Andrady, 2011; Koelmans et al., 2014). Plus de détails seront discutés dans la partie consacrée au phénomène de lixiviation (cf. 2.2.4).

En 2015, 25 millions de tonnes d'additifs ont été produites en Europe (Geyer et al., 2017), dont trois-quart seraient toxiques (Eurostat, 2021; Lynch et al., 2022). Certains polymères, tels que le PVC, le PE et le PS, contiennent les plus grandes concentrations d'additifs. Ainsi, près de 80 % du marché des additifs est destiné à la production de ces trois polymères. Parmi eux, le PVC est le polymère le plus additivé ; les additifs peuvent en effet constituer jusqu'à 50 % de la masse des plastiques en PVC (Rochman, 2015). A contrario, le PET en contient peu, de 1 à 2% m/m. L'ajout d'additifs est tout aussi important pour les polymères biosourcés et/ou biodégradables du fait de leurs propriétés physico-chimiques limitées qui doivent donc être améliorées (Khan et al., 2017). Les additifs ajoutés devraient eux aussi être biodégradables afin de ne pas compromettre la biodégradabilité des matériaux. Or, la plupart du temps les mêmes additifs conventionnels leur sont ajoutés (Havstad, 2020).

Les grandes familles d'additifs vont être présentés ci-dessous et dans le Tableau 2 avec quelques exemples d'additifs les plus fréquemment utilisés. Le **Tableau 3** associé, récapitule les effets toxiques observés de ces additifs sur les organismes marins et l'Homme.

#### 1.2.1.1. *Les plastifiants*

Les plastifiants sont ajoutés aux polymères pour augmenter leur flexibilité, leur conférer une certaine souplesse et faciliter leur formulation (Craver et al., 2000). Ils sont retrouvés dans une grande diversité de polymères et en plus grande quantité dans le PVC et le PS. Leur quantité varie généralement de 5 à 70% m/m (Hahladakis et al., 2018; Hansen et al., 2013; Rani et al., 2015).

Les plastifiants les plus répandus sont les phtalates. Ce sont des molécules chimiques synthétiques introduites sur le marché des plastifiants dans les années 1920. Les plus couramment utilisés sont le di(2-éthylhexyl)phthalate (DEHP), le Benzyl Butyl Phtalate (BBP), le di-n-butylphthalate (DBP), le diisodécylphthalate (DIDP) et le diisononylphthalate (DINP). En 2005, la production européenne de phtalates était estimée à environ 1 million de tonnes, dont 90 % destinés au PVC. Les molécules de phtalates font, pour la plupart, partie des substances fortement toxiques notamment pour leur potentiel rôle de perturbateur endocrinien et leurs actions carcinogènes et génotoxiques à de faibles concentrations (Andrady, 2011). Leur toxicité a d'ailleurs été démontrée sur divers organismes vertébrés et invertébrés marins ou terrestres (Andrady, 2011; ECHA, 2003; Oehlmann et al., 2009; Schrank et al., 2019) ainsi que chez l'Homme (Kamrin, 2009; Swan et al., 2005). En revanche, en 2006, la Commission Européenne a publié un rapport indiquant l'absence de toxicité des DINP et DIDP chez l'Homme adulte (EU Journal Officiel du 11 avril 2006) sur la base de dix années de travaux scientifiques

(European Commission, 2006). D'autres molécules, telles que les DEHP, BBP, DBP, DMP, DEP et DIBP ont été classées comme polluants prioritaires et sont catégorisées comme substances présumées toxiques, CMR par le règlement EU No. 143/2011 (European Commission, 2011b). En contrepartie, une étude portant sur la présence de divers phtalates dans des organismes allant de la base de la chaîne alimentaire (phyto et zooplancton) jusqu'aux grands mammifères n'a pas mis en évidence de bioamplification entre un niveau trophique inférieur et celui qui lui est supérieur (Mackintosh et al., 2004).

Eu égard à la toxicité avérée des phtalates, d'autres molécules ont été utilisées en remplacement pour assurer les fonctions de plastifiants. Les alternatives les plus répandues sont l'acétyl tributyl citrate (ATBC), le Bis(2-éthylhexyl) adipate (DEHA), le Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) et certains phénols. L'ATBC est le substitut aux phtalates le plus largement utilisé. Concernant les alternatives nous faisons face à un manque de recul et de connaissance sur leurs potentiels effets toxiques, notamment à cause du manque d'études et de données toxicologiques sur ces molécules émergentes. Les études de toxicité qui se sont portées sur l'ATBC n'ont pas montré de toxicité sur le développement, la reproduction ou de génotoxicité sur les modèles bactéries et mammifères (rats) utilisés, avec une  $DL_{50}^5 > 30$  g/kg de poids corporel (Johnson Jr, 2002). Le DINCH, un mélange complexe de neuf isomères (Silva et al., 2013), fait également partie de la nouvelle génération de plastifiants. Par rapport au DEHP, son potentiel de migration est moindre, tout comme sa toxicité (Chiellini et al., 2013). Une exposition au DINCH n'induirait aucune mutagénicité, génotoxicité ou toxicité sur la reproduction sur l'Homme ou des modèles mammifères comme le rat (NOAEL<sup>6</sup>= 1 g/kg de poids corporel) (Chiellini et al., 2013). Le DEHA, par contre, a provoqué des dommages sur le foie, le cerveau, le cœur (Behairy et al., 2021) et les ovaires (Wato et al., 2009) de rats (dose administrée, respectivement 2000 et 1000 g/kg de poids corporel). D'autres substituts existent tels que le butyryl trihexyl citrate, le triisooctyl citrate et l'acétyl triisooctyl citrate. Cependant leur utilisation n'est pas attractive à cause de leur coût de production élevé (Wang et al., 2018).

### 1.2.1.2. Les retardateurs de flamme

Les retardateurs de flamme sont des molécules chimiques permettant de diminuer l'inflammabilité de matériaux et améliorer leur stabilité thermique. Ils sont notamment employés dans le secteur de la construction (isolation, routes), de l'électronique et du packaging alimentaire (de Wit et al., 2010; Flameretardants-online, 2020; Wunsch, 2000).

Parmi les composés organiques, les additifs bromés et phosphorés sont les plus utilisés, particulièrement dans les produits en PS comme les PS expansés et extrudés. Leurs concentrations

<sup>5</sup> LD50 = dose létale médiane. Indique la dose d'une substance, administrée en une seule fois, qui cause la mort de la moitié (50%) de la population qui y est exposée.

<sup>6</sup> NOAEL de l'anglais "no observed adverse effect level", *i.e.* dose sans effet nocif observé, est la concentration ou quantité maximale d'une substance qui n'induit aucun effet nocif dans une population qui y est exposée.

dans les polymères varient généralement entre 3 et 18% m/m (Al-Odaini et al., 2015; Gächter et al., 1993; Hansen et al., 2013). En 2019, la consommation totale de retardateurs de flamme dans le monde a été de 2,39 millions de tonnes, dont 18% de retardateurs de flamme phosphorés (RFP) (*i.e.* 430 200 tonnes) et 17% de retardateurs de flamme bromés (RFB) (*i.e.* 406 300 tonnes). L'Europe représente 25% de cette consommation globale (*i.e.* 597 500 tonnes) (Flameretardants-online, 2020).

Il existe environ 75 molécules de RFB commercialisées, ayant des propriétés et des toxicités spécifiques (European Flame Retardants Association, 2007). Les polybrominated biphenyls (PBBs) et les polybrominated diphenyl éthers (PBDEs) sont les premiers RFB à avoir été utilisés à grande échelle (La Guardia et al., 2006; Pijnenburg et al., 1995; Rios Mendoza et al., 2017). Le 1,2-Bis(2,4,6-tribromophénoxy)éthane (BTBPE) et l'hexabromocyclododécane (HBCD) ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD) sont d'autres RFB largement utilisés (Covaci et al., 2006; Covaci et al., 2011). Du fait de leur toxicité (perturbateurs endocriniens, neurotoxiques, hépatotoxiques) (Hana et al., 2004; Meeker and Stapleton, 2010; Palace et al., 2008), et de leur haute biodisponibilité pour les organismes (Sellström et al., 1998), ces molécules sont peu à peu remplacées par le TBBPA et par les RFP (Covaci et al., 2009). Le TBBPA est désormais un des retardateurs de flamme les plus importants : il représente environ 60% du total du marché des retardateurs de flamme (Covaci et al., 2011; Covaci et al., 2009; Liu et al., 2016). Ce composé possède en effet une efficacité et une stabilité thermique supérieures. Cependant, plusieurs études lui ont attribué différents effets toxiques : toxicité aiguë, effet cancérigène (modèle rongeur), perturbation endocrinienne notamment sur les hormones thyroïdiennes, effet neurotoxique, et effet toxique sur le développement (Lai et al., 2015; Van der Ven et al., 2008; Yu et al., 2019; Zhang et al., 2014; Zhou et al., 2020).

Les RFP sont des substituts aux RFB et sont aussi utilisés en tant que plastifiants selon les applications (Hahladakis et al., 2018). Les plus utilisés sont le triphényl phosphate (TPhP), tricrésylphosphate (TCP), tris(2-chloroéthyl)phosphate (TCEP), tris(chloropropyl)phosphate (TCPP), tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) (Alaee et al., 2003; de Wit et al., 2010), mais certains d'entre eux peuvent être neurotoxiques et jouer le rôle de perturbateurs endocriniens (Meeker and Stapleton, 2010) engendrant des effets néfastes sur la reproduction et le développement (Han Li et al., 2015; van der Veen and de Boer, 2012; Xiang et al., 2017).

### 1.2.1.3. Les antioxydants et les anti-UVs

Les antioxydants et anti-UVs permettent d'éviter la dégradation et la perte des propriétés des polymères en empêchant l'oxydation du matériau ou en absorbant les rayonnements UVs. Ces molécules sont celles qui subissent les dégradations, préservant de fait l'intégrité du polymère (Lau and Wong, 2000) et permettent donc de ralentir le vieillissement du polymère et d'augmenter sa durée de vie. Ils sont utilisés dans tous les polymères commercialisés, généralement ajoutés aux polymères à des concentrations allant de 0,05 à 3 % m/m (Hahladakis et al., 2018; Hansen et al., 2013). Les

molécules les plus souvent employées sont mentionnées dans le **Tableau 2**. Les antioxydants sont majoritairement intégrés dans les produits en PP et les PE qui représentent environ 60% de la demande globale pour les antioxydants (Höfer, 2012; Lahimer et al., 2017; Pritchard, 2012). Parmi les classes d'antioxydants, sont retrouvés les composés organophosphorés, les phénols, les thioesters et les amines (Bolgar et al., 2016; Hahladakis et al., 2018; Rani et al., 2015).

Les alkylphénols et les alkylphénols éthoxylés ont plusieurs propriétés. Ils sont utilisés majoritairement comme antioxydants, mais également comme lubrifiants et parfois comme plastifiants (Fasano et al., 2012). Les nonylphénols éthoxylates sont les plus utilisés dans l'industrie, ils représentent environ 80% de la production mondiale des additifs, qui était estimée en 2009 à 700 000 tonnes (Eganhouse et al., 2009). Les nonylphénols, les octylphénols (OPs) et les OPs éthoxylates représentent quasiment les 20% restants (Brooke and Thursby, 2005). Les nonylphénols et OPs sont également des produits de la dégradation de leurs dérivés éthoxylés, lors de processus industriels ou bien une fois dans l'environnement via des processus d'oxydation par biodégradation (Engler, 2012; Giger et al., 2009; Staples et al., 2004). Leur analyse n'est pas évidente car il existe plus de 200 isomères (Li et al., 2018). Actuellement, la production et l'utilisation des nonylphénols et des nonylphénols éthoxylates est interdite dans l'UE selon l'annexe XVII de REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques) (European Commission, 2021) à cause de leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. De la même façon, les OPs et OPs éthoxylates font partie des molécules soumises à autorisation par la réglementation REACH. En effet, ces groupes de molécules sont des perturbateurs endocriniens pouvant altérer les fonctions métaboliques, immunitaires et créer des dommages à l'ADN aussi bien pour les organismes aquatiques (algues, invertébrés, poissons, mammifères) que pour l'Homme (Nice et al., 2003; Shelley et al., 2012; Soares et al., 2008; Soto et al., 1991; Tato et al., 2018; Yokota et al., 2001). De plus, en raison de leur hydrophobicité, ils peuvent être bioaccumulés dans les tissus (Servos, 1999; Tsuda et al., 2000) et dans l'environnement dans lesquels ils sont maintenant ubiquitaires (Fasano et al., 2012).

Le bisphénol A (BPA) est aussi un composé très largement utilisé, sa production mondiale s'élève à plus de 3 millions de tonnes chaque année (Laing et al., 2016). Le BPA a des fonctions diverses, il est utilisé en tant qu'intermédiaire dans la production de polymères car c'est un constituant (monomère) du polycarbonate et des résines époxy et il est aussi utilisé en tant qu'additif antioxydant ou stabilisateur pour les polymères et les plastifiants (Hahladakis et al., 2018; Rani et al., 2015; Rios Mendoza et al., 2017; Staples, 2003). Plusieurs études ont maintenant démontré la toxicité du BPA sur les organismes marins terrestres ainsi que sur l'Homme en tant que perturbateur endocrinien, cancérigène et induisant des problèmes métaboliques et de développement (Balbi et al., 2016; ECHA, 2017; Markey et al., 2001; Özlem and Hatice, 2008; Wadia et al., 2013). Le BPA a donc été remplacé par ses molécules analogues : les bisphénols B, F et S (BPB, BPF, BPS) (Chen et al., 2016). A l'instar du BPA, ces substituts peuvent également représenter un danger en étant, eux aussi, des perturbateurs

endocriniens (İyigündoğdu et al., 2020; Serra et al., 2019) et sont autant, voire plus toxiques que le BPA, comme l'ont publié l'ANSES (2021) et l'étude Gayrard et al. (2019), qui ont, respectivement, mentionné un potentiel de bioaccumulation plus prononcé du BPB par rapport au BPA et une biodisponibilité plus élevée du BPS par rapport au BPA.

Plusieurs autres molécules sont souvent utilisées en tant qu'antioxydants, *e.g.* l'hydroxy toluène butylé (BHT) ; l'Irganox®1010, Irganox® 1076, Irgafos® 168, qui sont omniprésents dans divers emballages plastiques mais moins étudiés au niveau de leurs potentiels impacts toxiques. Une étude *in vitro* a démontré quelques effets négatifs de la forme oxydée de l'Irgafos® 168 sur la croissance de cellules humaines en culture (Hammond et al., 2013). Le BHT quant à lui n'a pas encore été reconnu comme perturbateur endocrinien par la réglementation REACH, bien qu'il soit mentionné dans le rapport du Programme des Nations unies pour l'environnement (UNEP) sur les perturbateurs endocriniens (UNEP, 2018) et que différentes études aient observé des effets œstrogéniques (Miller et al., 2001; Pop et al., 2018) et de perturbation endocrinienne (Rajamani et al., 2017).

Concernant les anti-UVs ; les benzophénones, les benzotriazoles et les amines (aussi utilisées comme antioxydants) sont les plus largement utilisées (Bolgar et al., 2016). Par contre, leur toxicité est peu renseignée dans la littérature. Différentes études ont classé les benzotriazoles comme contaminants émergents et ont mentionné leur caractère mutagène, bioaccumulable, et de perturbateurs endocriniens (Kawamura et al., 2003; Kim et al., 2011; La Farre et al., 2008; Nakata et al., 2009). L'UNEP les a en effet reconnus comme tel, dans son rapport de 2018 (UNEP, 2018), cependant, ils ne sont pas encore entrés dans la réglementation REACH à l'exception de l'hostavin N20 (7-Oxa-3,20-diazadispiro[5.1.11.2]heneicosan-21-one, 2,2,4,4-tétraméthyl-) qui a été classé par l'ECHA (agence européenne des produits chimiques) comme très toxique pour les organismes marins et dont la production et l'importation sont maintenant réglementées par REACH (ECHA, 2022). De la même façon, l'UV 320 (2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1,1-diméthylethyl)-phénol) n'est soumis à aucune restriction en Europe, malgré le fait que des effets toxiques sur le foie et autres tissus de mammifères (rats) et une capacité à se bioaccumuler aient été démontrés en laboratoire, contrairement au Japon qui a interdit sa production, son utilisation et son importation (Ema et al., 2008).

### 1.2.2. Les NIAS

Les substances intentionnellement ajoutées aux polymères que représentent les additifs, les catalyseurs et les charges ne sont pas les seuls constituants des matériaux plastiques. Des substances non intentionnellement ajoutées, dites NIAS pour « non intentionally added substances », font aussi partie de la composition des matériaux plastiques. Les NIAS sont des impuretés présentes dans les matériaux plastiques, comme des résidus de solvants ou encore des produits de dégradation et sous-produits issus des additifs ou des polymères eux-mêmes. Ces impuretés sont généralement formées

durant les étapes de fabrication, où peuvent se produire diverses interactions entre tous les ingrédients ajoutés (Alin and Hakkarainen, 2011; Groh et al., 2019; Nerin et al., 2013). Ces produits sont donc nombreux et, au même titre que les additifs, capables de migrer du plastique (Denberg et al., 2009). Très divers, ils présentent des dangers pour l'environnement, les organismes ou encore la santé humaine (Groh et al., 2019; Nerin et al., 2013; Tian et al., 2021). L'identification des NIAS est complexe. Certains NIAS ont déjà pu être identifiés avec l'aide de techniques analytiques sensibles mais leur structure chimique est souvent difficile à déterminer (Bradley et al., 2007; Paseiro-Cerrato et al., 2016; Vera et al., 2018).

Tableau 2 : Additifs plastiques organiques les plus communément utilisés

Molécules	Abréviations	PubChem ID	N° CAS	Formule chimique	MM (g/mol)	Concentration (% m/m)	Utilisation dans les MCDA
<b>Antioxydants</b>							
4-tert-Butylphénol	<b>4-TBP</b>	7393	98-54-4	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150.2	ND	Oui
Ethylènebis(oxyéthylène) bis[3-(5-tert-butyl-4-hydroxy-m-tolyl)propionate]	-	91620	36443-68-2	C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	586.8	0,005-3%	Oui
Butylated hydroxytoluène	<b>BHT</b> °	31404	128-37-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220.3	0,05-3%	Oui
Bisphenol A	<b>BPA</b> ° a	6623	80-05-7	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228.3	0,05-3%	Oui
Bisphenol B	<b>BPB</b> ° a	66166	77-40-7	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	242.3	ND	Non
Bisphenol F	<b>BPF</b> ° a	12111	620-92-8	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	200.2	ND	Non
Bisphenol S	<b>BPS</b> ° a	6626	80-09-1	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S	250.3	ND	Oui
2,6-di-tert-butyl phénol	<b>Ethanox® 701</b> °	31405	128-39-2	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206.3	ND	Oui
Tris(2,4-ditert-butylphenyl) phosphite	<b>Irgafos® 168</b> °	91601	31570-04-4	C <sub>42</sub> H <sub>63</sub> O <sub>3</sub> P	646.9	0,004-0,5%	Oui
Pentaerythrityl-tetrakis-3-(3,5-di-tert-butyl-4hydroxyphenyl)propionate	<b>Irganox® 1010</b> °	64819	6683-19-8	C <sub>73</sub> H <sub>108</sub> O <sub>12</sub>	1177.6	0,002-0,5%	Oui
thiodiéthanol bis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy phenyl) propionate)	<b>Irganox® 1035</b> °	64883	41484-35-9	C <sub>38</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> S	642.4	ND	Oui
3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamic acid, octadécyl ester	<b>Irganox® 1076</b> °	16386	2082-79-3	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>	530.9	0,002-0,4%	Oui
6,6'-di-tert-butyl-2,2'-thiodi-p-crésol	<b>Irganox® 1081</b> °	66661	90-66-4	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> S	358.5	ND	Non
2,4-bis(octylthiométhyl)-6-méthylphénol	<b>Irganox® 1726</b> °	6850816	110675-26-8	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> OS <sub>2</sub>	537.0	ND	Oui
2-(1,1-diméthyléthyl)-6- [3-(1,1-diméthyléthyl)-2-hydroxy-5-méthylphénylméthyl-4-méthylphényl acrylate	<b>Irganox® 3052</b> °	109058	61167-58-6	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	394.5	ND	Oui
3,3',3'',5,5',5''-hexa-tert-butyl- $\alpha,\alpha',\alpha''$ -(mesitylene-2,4,6-triyl)tri-p-crésol	<b>Ionox® 330</b> °	74370	1709-70-2	C <sub>54</sub> H <sub>78</sub> O <sub>3</sub>	775.2	0,5-2.5%	Oui
1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione	<b>Irganox® 3114</b>	93115	27676-62-6	C <sub>48</sub> H <sub>69</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	784.1	0,4-0.8%	Oui
2,5-Di-tert-amylhydroquinone	<b>Lowinox® AH25</b> °	6610	79-74-3	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	250.4	ND	Non
6,6'-di-tert-butyl-4,4'-thiodi-m-crésol	<b>Lowinox® TBM-6</b> °	7308	96-69-5	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> S	358,5	0,001-0,5%	Oui
6,6'-di-tert-butyl-4,4'-butyldiene-di-m-crésol	<b>Lowinox® 44B25</b>	6815	85-60-9	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	382.6	0,5%	Oui
Nonylphenols * et dérivés éthoxylés	<b>NPs et NPEO</b> ° h	-	-	-	220.3	0,05-3%	Non
Octylphénols et dérivés éthoxylés	<b>OPs et OPEO</b> ° h	-	-	-	264.2	0,05-3%	Non
Poly(4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthyl-1-piperidine éthanol-alt-1,4-butanedioic acid)	<b>Tinuvin® 622</b>	54328974	65447-77-	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	313.4	ND	Oui

Tableau 2 (suite - 2/4)

Molécules	Abréviations	PubChem ID	N° CAS	Formule chimique	MM (g/mol)	Concentration (% m/m)	Utilisation dans les MCDA
<b>Plastifiants</b>							
Bis(tridecyl) adipate	-	85653	16958-92-2	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>4</sub>	510.8	10-35%	ND
2,4-dibromophénol	<b>2,4-DBP<sup>a</sup></b>	12005	615-58-7	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> O	251.2	< 0,001%	ND
Acetyl Tributylcitrate	<b>ATBC<sup>a</sup> <sup>ε</sup></b>	6505	77-90-7	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	402.5	10-35%	Oui
Benzyl butyl phthalate	<b>BBP<sup>a</sup></b>	2347	85-68-7	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	312.4	0,10%	Oui
Trihexyl-O-butylcitrate	<b>Citroflex<sup>®</sup> B6<sup>a</sup></b>	133914	82469-79-2	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	514,7	ND	Non
Di-allyl phtalate	<b>DAIP<sup>a</sup></b>	8560	131-17-9	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	246.3	10-35%	Oui
Dibutyl adipate	<b>DBA</b>	7784	105-99-7	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	258.3	10-35%	Oui
Dibutyl phthalate	<b>DBP<sup>a</sup></b>	3026	84-74-2	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.3	0,10%	Oui *
Dibutylsébacate	<b>DBS<sup>a</sup></b>	7986	109-43-3	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	314.5	ND	oui
Dibutyl-téréphtalate	<b>DBTP</b>	16066	1962-75-0	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.3	10-35%	Non
Dicyclohexyl phthalate	<b>DCHP</b>	6777	84-61-7	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	330.4	< 0,001%	Non
Di-2-éthylhexyl adipate	<b>DEHA<sup>a</sup></b>	7641	103-23-1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	370.6	10-35%	Oui
Di (2-éthylhexyl) phthalate	<b>DEHP<sup>a</sup></b>	8343	117-81-7	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.6	0,10%	oui *
Diéthyl phthalate	<b>DEP</b>	6781	84-66-2	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222.2	10-70%	Oui
Di-n-hexyl phthalate	<b>DHP</b>	6786	84-75-3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	334.4	ND	Non
Diisobutyl phthalate	<b>DiBP</b>	6782	84-69-5	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.3	0,10%	Oui *
Diisotridécyl adipate	<b>DIDA</b>	94369	26401-35-4	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>4</sub>	510.8	10-35%	ND
Diisodécyl phthalate	<b>DIDP<sup>a</sup></b>	33599	68515-49-1	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	446.7	10-35%	oui *
Diisoheptyl phthalate	<b>DIHP</b>	591200	41451-28-9	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	362.5	10-70%	non
Di-isononyl adipate	<b>DiNA<sup>a</sup></b>	6427097	33730-08-1	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	398.6	10-35%	ND
Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate	<b>DINCH<sup>a</sup></b>	11524680	166412-78-8	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	424.7	10-35%	oui
Diisononyl phthalate	<b>DINP<sup>a</sup></b>	590836	68515-48-0	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	418.6	10-35%	oui *
Diisooctylphthalate	<b>DIOP</b>	33934	27554-26-3	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.6	ND	oui
Di-isotridécyl phthalate	<b>DITP</b>	161559	36901-61-8	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> O <sub>4</sub>	530.8	10-35%	ND
Diméthylphthalate	<b>DMP</b>	8554	131-11-3	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.2	10-70%	Oui
Di-n-butyl phthalate	<b>DnBP</b>	3026	84-74-2	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.3	10-35%	Oui
Di-n-hexyl phtalate	<b>DnHP</b>	6786	84-75-3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	334.4	10-70%	Non



Tableau 2 (suite - 3/4)

Molécules	Abréviations	PubChem ID	N° CAS	Formule chimique	MM (g/mol)	Concentration (% m/m)	Utilisation dans les MCDA
<b>Plastifiants (suite)</b>							
Di-n-nonyl phthalate	<b>DnNP</b>	6787	84-76-4	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	418.6	ND	Non
Di-n-octyl phthalate	<b>DnOP</b>	8346	117-84-0	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.6	ND	Oui
Di-n-propyl phthalate	<b>DnPP</b>	8559	131-16-8	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	250.3	ND	Non
Di-octyl adipate	<b>DOA</b>	31271	123-79-5	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	370,6	10-70%	Oui
Di(2-propylheptyl) phthalate	<b>DPHP</b>	92344	53306-54-0	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	446.7	10-35%	Non
Tri(2-éthylhexyl) phosphate	<b>TEHPA<sup>a</sup></b>	6537	78-42-2	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub> P	434,6	ND	Oui
<b>Retardateurs de flamme</b>							
2,4,6-tribromophénol	<b>2,4,6-TBP</b>	1483	118-79-6	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>3</sub> O	330.8	ND	Non
1,2-bis(2,4,6tribromophénoxy)éthane	<b>BTBPE<sup>a</sup></b>	37840	84852-53-9	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Br <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	687.6	15-35%	Non
Poly bromodiphényl éther	<b>PBDEs<sup>a</sup></b>	-	-	-	-	3-50%	Non
Tétrabromobisphénol A	<b>TBBPA<sup>a</sup> d</b>	6618	79-94-7	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	543.9	5-10%	Non
Tributyl citrate	<b>TBC</b>	6507	77-94-1	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	360.4	ND	Oui
Tributylphosphate	<b>TBP<sup>a</sup></b>	31357	126-73-8	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	266.3	ND	Oui
Tris(2-chloroéthyl)phosphate	<b>TCEP<sup>a</sup> h</b>	8295	115-96-8	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	285.5	3-25%	Oui
Tricrésyl phosphate (isomères)	<b>TCP<sup>a</sup> h</b>	6529	-	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	368,4	ND	Non
Tris(1-chloro-2-propyl) phosphate	<b>TCPP<sup>a</sup></b>	26176	13674-84-5	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	327.6	3-25%	Non
Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate	<b>TDCPP<sup>a</sup></b>	26177	13674-87-8	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>4</sub> P	430.1	ND	Non
Triéthyl citrate	<b>TEC</b>	6506	77-93-0	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	276.3	ND	Oui
Triéthylphosphate	<b>TEP<sup>a</sup></b>	6535	78-40-0	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	182.1	10%	Non
Triphényl phosphite	<b>TPHP<sup>a</sup></b>	8289	115-86-6	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> P	326.3	2%	Non
Tripropyl phosphate	<b>TPrP<sup>a</sup></b>	10546	513-08-6	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	224,2	ND	ND
Tri-o-tolyl phosphate	<b>TTOP<sup>a</sup></b>	6527	78-30-8	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	368,4	ND	ND
Gamma- hexabromocyclododécane ( $\gamma > \beta > \alpha$ )	<b><math>\gamma</math>-HBCD<sup>a</sup></b>	11377211	134237-52-8	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	641.7	4-7%	Non
Triphényl phosphates isopropylated	-	75628	68937-41-7	C <sub>90</sub> H <sub>96</sub> O <sub>16</sub> P <sub>4</sub>	452,5	15-35%	Non

Tableau 2 (suite – 4/4)

Molécules	Abréviations	PubChem ID	N° CAS	Formule chimique	MM (g/mol)	Concentration (% m/m)	Utilisation dans les MCDA
<b>Stabilisateurs UVs</b>							
1,5,8,12-Tétrakis[4,6-bis(N-butyl-N-1,2,2,6,6-pentaméthyl-4-pipéridylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]-1,5,8,12-tétraazadodécane	<b>Chimassorb® 119</b>	163763	106990-43-6	C <sub>132</sub> H <sub>250</sub> N <sub>32</sub>	2285.6	1.5%	Oui
Diisodécyl phényl phosphite	<b>DDPP</b>	16212880	25550-98-5	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub> P	438.6	0,03	Non
Dibutyltin méthyl maléate	-	16683073	15546-11-9	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> Sn	491.1	0,002-0,5%	ND
Triisodécyl phosphite	-	117488	25448-25-3	C <sub>30</sub> H <sub>63</sub> O <sub>3</sub> P	502.8	2%	Oui
2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-crésol	<b>Tinuvin® PED</b>	17113	2440-22-4	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O	225.2	0,0015-0.5%	Oui
2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phénol	<b>UV-327<sup>°</sup></b>	77470	3864-99-1	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O	357.9	ND	Oui
2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-méthyl-1-phényléthyl)phénol	<b>UV-328<sup>°</sup></b>	33263	25973-55-1	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O	351.5	0,2-5.0%	Non
Bisoctrizole = 2,2'-méthylènebis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetraméthylbutyl)phénol)	<b>UV-360<sup>°</sup></b>	3571576	103597-45-1	C <sub>41</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	658.9	0,2-5%	Non
Bumétrizole = 2-(tert-Butyl)-6-(5-chloro-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-yl)-4-méthylphénol	<b>UV-326<sup>°</sup></b>	62531	3896-11-5-	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	315.8	0,3-1.0%	Oui
Octabenzone = 2-hydroxy-4-octyloxybenzophénone	<b>Uvinul® 3008<sup>°</sup></b>	15797	1843-05-6	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	326.4	0,2-5%	Oui
Oxybenzone = 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone	<b>Uvinul® 3040</b>	4632	131-57-7	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,2	ND	Oui
2,2-dihydroxy-4,4-diméthoxybenzophénone	<b>Uvinul® 3049<sup>°</sup></b>	8570	131-54-4	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub>	264.3	ND	Non

ND : données Non Disponibles.

Additifs aussi utilisés en tant que <sup>a</sup> : monomères ; <sup>b</sup> : plastifiants ; <sup>c</sup> : retardateurs de flamme et <sup>d</sup> : antioxydants.

\* : autorisés uniquement dans les matériaux à usages uniques et les articles qui ne sont pas en contact avec des matières grasses. Interdits dans les matériaux dont l'usage est destiné aux enfants.

<sup>°</sup> : données sur la toxicité dans le **Tableau 3**.

**Références** : (Aquaref, 2018; Bolgar et al., 2016; ECHA, 2019; European commission, 2005b; European Commission, 2011a; Fries et al., 2013; Gauque et al., 2015; Groh et al., 2019; Groh et al., 2020; Hahladakis et al., 2018; Hermabessiere et al., 2017; Lahimer et al., 2017; Lau and Wong, 2000; Net et al., 2015; Rani et al., 2015; Rios Mendoza et al., 2017; Serra et al., 2019)

Tableau 3 : Exemple de données de toxicité (non exhaustif) pour les additifs plastiques organiques majoritaires

Molécules	Toxicité	Références	
<b>Antioxydants</b>			
<b>NPs et dérivés éthoxylés</b>	PE + modification du métabolisme	[1] ; [2] ; [3] ; [4] ; [34]	
<b>OPs et dérivés éthoxylés</b>	PE + modification du métabolisme	[3] ; [4] ; [5]	
<b>BHT</b>	PE ; PBT Toxique pour le milieu aquatique et les organismes Faible toxicité aiguë (mammifères)	[4] ; [9] ; [7]	
<b>Bisphénols A, B, F et S</b>	SVHC ; PE ; Cancérigène ; Reprotoxique ; Cause des problèmes cardiovasculaires, de développement et de métabolisme	[4] ; [8] ; [9] ; [10] ; [35] ; [36]	
<b>Ethanox® 701</b>	Cause des dommages au foie et carcinogène (suspecté)	[7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Irgafos® 168</b>	Cause des dommages au foie et carcinogène (suspecté)	[7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 1010</b>	Cause des dommages au foie et carcinogène (suspecté) Faible toxicité aiguë (mammifères)	[4] ; [7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 1035</b>	Non toxique	[11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 1076</b>	Peu toxique	[4] ; [7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 1081</b>	PBT	[11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 1726</b>	Cause des dommages au foie et carcinogène (suspecté)	[7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Irganox® 3052</b>	Cause des dommages au foie et carcinogène (suspecté)	[7] ; [11] ; [12] ; [13]	
<b>Ionox® 330</b>	PE Faible toxicité aiguë (rat)	[11] ; [12] ; [13]	
<b>Lowinox® AH25</b>	PBT Toxique pour le milieu aquatique et les organismes	[11] ; [12] ; [13]	
<b>Lowinox® TBM-6</b>	PE ; PBT Toxique pour le milieu aquatique et les organismes	[11] ; [12] ; [13]	
<b>Plastifiants</b>			
<b>2,4-DBP</b>	PBT Toxique pour le milieu aquatique et les organismes	[14]	
<b>ATBC</b>	Très faiblement toxique	[4] ; [15]	
<b>Citroflex® B6</b>	PBT Toxique pour le milieu aquatique et les organismes	[11]	
<b>Phtalates</b>	PE Toxiques pour les organismes aquatiques et l'Homme	[4] ; [14] ; [16] ; [17] ; [18] ; [19]	
	<i>Exemples</i>		
	BBP, DBP, DEHP, DIHP, DCHP, DIBP, DnBP		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parmi les phtalates les plus toxiques</li> <li>• PE suspecté cancérigène pour les organismes aquatiques</li> </ul>
	DAIP		<ul style="list-style-type: none"> <li>• CMR</li> <li>• Cytotoxique</li> </ul>
	DIDP, DINP	Pas de toxicité chez l'Homme adulte	
<b>DiNA</b>	Toxicité aiguë	[14]	
<b>DINCH</b>	Faible toxicité aiguë (rat) Potentiel cancérigène sur la thyroïde du rat Toxique pour les organismes aquatiques	[20] ; [21]	
<b>DBS</b>	Non toxique	[14]	
<b>DEHA</b>	PE Suspecté cancérigène Induit des problèmes de développement Toxique pour le foie et les voies respiratoires	[14] ; [22]	

Tableau 3 (suite – 2/2)

Molécules	Toxicité	Références
<b>Retardateurs de flamme</b>		
<b>TEHPA</b>	PE Cancérogène (rats) Toxicité aigüe (algues)	[14] ; [23]
<b>BTBPE, PBDEs, HBCD, 2,4,6-TBP</b>	PBT ; PE ; vPvB Toxique pour la vie aquatique	[14] ; [24] ; [25]
<b>TBBPA</b>	PBT ; PE Potentiel carcinogène Toxique pour les hormones thyroïdiennes	[4] ; [14] ; [18] ; [25] ; [26]
<b>Retardateurs de flamme phosphorés (TBP, TCEP, TCPP, TDCPP)</b>	Carcinogène ; Reprotoxique ; Neurotoxiques ; Cytotoxiques Effets à long terme	[14] ; [27] ; [28] ; [29] ; [30]
	<i>Exemples</i>	
	<b>TCP</b> <b>TPhP</b> Parmi les phosphates les plus dangereux Induit des dommages aux organes Toxique pour les organismes aquatiques	
	<b>TEP</b> <b>TToP</b> Mutagène, Reprotoxique	
<b>TPrP</b>	CMR Toxicité aigüe	
<b>Stabilisateurs UVs</b>		
<b>UV-326, 531, 360</b>	PBT ; PE Mutagènes Toxiques pour la vie aquatique	[12] ; [13] ; [14] ; [31] ; [32]
<b>UV-327, 328</b>	PBT ; PE ; vPvB Mutagènes Toxiques pour la vie aquatique	[12] ; [13] ; [14] ; [31] ; [32] ; [37]
<b>UV-320</b>	PE ; vPvB Toxique pour le foie (rat)	[33] ; [37]
<b>Uvinul® 3049</b>	PE Peu bioaccumulable	[14] ; [15]
<b>Uvinul® 3008</b>	Toxiques pour la vie aquatique Peu toxique pour les mammifères	[14] ; [15]
<p>PE : perturbateur endocrinien ; PBT : substance persistante, bioaccumulable et toxique ; SVHC (Substances of Very High Concern) : substances extrêmement préoccupantes ; vPvB (very persistent and very bioaccumulative) : substance très persistante et très bioaccumulable ; CMR : Cancérogène Mutagène Reprotoxique.</p> <p><u>Références</u> : [1] : (Nice et al., 2000) ; [2] : (Nice et al., 2003) ; [3] : (Senthil Kumaran et al., 2011) ; [4] : (ECHA, 2019) ; [5] : (Raychoudhury et al., 1999) ; [6] : (Brocca et al., 2002) ; [7] : (Rani et al., 2017) ; [8] : (Serra et al., 2019) ; [9] : (İyigündoğdu et al., 2020) ; [10] : (Galloway, 2015) ; [11] : (Lahimer et al., 2017) ; [12] : (Kawamura et al., 2003) ; [13] : (Nakata et al., 2009) ; [14] : (Bolgar et al., 2016) ; [15] : (Muncke, 2011) ; [16] : (Fries et al., 2013) ; [17] : (He et al., 2013) ; [18] : (EFSA, 2016) ; [19] : (Adams et al., 1995) ; [20] : (Saad et al., 2021) ; [21] : (Bhat et al., 2014) ; [22] : (Behairy et al., 2021) ; [23] : (Kojima et al., 2013) ; [24] : (Huang et al., 2021) ; [25] : (Frederiksen et al., 2007) ; [26] : (Lai et al., 2015) ; [27] : (Deng et al., 2018) ; [28] : (van der Veen and de Boer, 2012) ; [29] : (Meeker and Stapleton, 2010) ; [30] : (Han Li et al., 2015) ; [31] : (La Farre et al., 2008) ; [32] : (Kim et al., 2011) ; [33] : (Ema et al., 2008) ; [34] : (Soto et al., 1991) ; [35] : (Markey et al., 2001) ; [36] : (Wadia et al., 2013) ; [37] : (European Commission, 2021)</p>		

### 1.3. Les réglementations en vigueur pour les matériaux plastiques et les substances associées

Selon Wiesinger et al. (2021), environ 5 800 molécules seraient utilisées en tant qu'additifs plastiques, et l'ECHA a caractérisé et listé plus de 400 substances parmi celles les plus utilisées comme additifs plastiques (ECHA, 2019) dont la plupart sont réglementées sous différentes législations européennes ou américaines. Plusieurs réglementations s'appliquent aux matériaux plastiques et aux substances chimiques utilisées pour leur fabrication. Elles concernent les règles relatives à l'importation et l'utilisation de substances (connues comme étant toxiques), et incluent aussi de plus en plus de restrictions sur la fin de vie de divers matériaux. A ce jour, il n'existe pas ou peu de réglementations pour les plastiques non alimentaires. Ces réglementations portent majoritairement sur les MCDA, sur les plastiques biodégradables, ou sont spécifiques à des substances chimiques selon leur domaine d'application (*e.g.* cosmétique, jouets pour bébé).

#### 1.3.1. Les réglementations concernant les matériaux plastiques et les substances associées

La première réglementation à apporter un cadre harmonisé à l'échelle européenne pour les MCDA est la directive Européenne No 1935/2004 établie en 2004 (European Commission, 2004) qui porte sur la sécurité sanitaire et implique le caractère inerte de tous les MCDA. Actuellement, la ligne de conduite européenne la plus complète est la directive de l'UE No 10/2011 (European Commission, 2011a) qui s'applique à tous les matériaux et les articles destinés à être en contact avec les denrées alimentaires. Ce règlement comporte une série de documents et d'annexes renseignant, entre autres, sur différents points de la production et utilisation des MCDA tels que les modalités de contrôle de la bonne conformité des matériaux, le statut des substances utilisées pour leur production, les essais et les normes de limite de migration des substances ajoutées intentionnellement aux plastiques. L'annexe I de cette réglementation a établi une liste dite « positive » qui présente les substances autorisées dans les MCDA et des spécifications, ciblées ou par groupes de substances, telles que des restrictions quantitatives, exprimées en % m/m, et les limites de migration spécifiques ou globales, exprimées en mg/kg d'aliments. Ces restrictions ont été établies avec l'aide de l'évaluation du risque effectuée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Cette liste prend en compte : (a) les monomères ou autres substances de départ, (b) les additifs (sauf les colorants), (c) les polymères et autres substances d'aide à la formulation (sauf les solvants) et enfin (d) les macromolécules obtenues à partir de la fermentation microbienne. La directive de l'UE prend aussi en compte certains NIAS dont l'identification a été possible (somme des NIAS) potentiellement présents dans les MCDA. L'EFSA réévalue régulièrement les risques liés à l'exposition aux molécules d'additifs, mettant à jour leur rapport scientifique d'évaluation des risques sanitaires. Cependant, les molécules

sont testées individuellement et l'effet combiné des molécules, *i.e.* effet cocktail, potentiellement synergique, n'est pas pris en compte.

Quelques années plus tard, début 2018, et dans une démarche de transition vers une économie circulaire, la Commission européenne a adopté la toute première stratégie sur les matières plastiques (European Commission, 2018a). Elle vise à réduire voire interdire la consommation de plastiques à usage unique et augmenter la part d'emballages en plastique recyclés sur le marché avec pour objectif d'atteindre les 100% d'ici 2030. En 2018, la loi EGalim 2018-938 – portant sur l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous – agit aussi sur l'utilisation de matériaux plastiques (Journal officiel, 2018). Cette loi interdit dès 2020 l'utilisation de bâtonnets d'agitation et pailles en plastiques dans la restauration, la vente à emporter, les cantines et les commerces alimentaires ainsi que la mise à disposition de bouteilles d'eau en plastique dans les cantines scolaires ; et dès 2025 l'utilisation des contenants alimentaires en plastique dans la restauration collective des collectivités locales (Journal officiel, 2018). Le 5 juin 2019, une nouvelle directive Européenne No 2019/904 (European Commission, 2019) a vu le jour et interdit, depuis juillet 2021, la mise sur le marché de plusieurs produits plastiques les plus fréquemment trouvés sur les plages et dans les mers d'Europe : produits à usage unique (*e.g.* pailles, couverts et assiettes, bâtonnets d'agitation, gobelets et cotons-tiges) et produits à base de plastiques oxodégradables<sup>7</sup>(*e.g.* sacs). Cette même réglementation renforce les règles concernant les engins de pêche contenant du plastique (*e.g.* filets, casiers, nasses, etc.) et implique un marquage, un suivi et incite à la collecte de ces engins pour éviter leur rejet inapproprié en mer.

Les plastiques biodégradables sont aussi soumis à des réglementations qui leur sont spécifiques. Afin de pouvoir être utilisés et attribués de la mention « biodégradable » pour une mise en compost industriel ou domestique, deux principales normes sont en vigueur :

- La norme NF EN 13432 : 2000 concernant la valorisation des emballages par biodégradation en condition de compostage industriel (ADEME et al., 2020).
- La norme NF T 51-800 : 2015 concernant les spécifications pour les plastiques aptes au compostage domestique (ADEME et al., 2020).

Afin de répondre à ces deux normes, les matériaux biodégradables doivent répondre à plusieurs exigences multicritères :

---

<sup>7</sup> Se dit d'un matériau qui est rendu biodégradable en présence d'oxygène grâce à l'addition d'agents facilitant l'oxydation (Journal officiel, 2016).

- Caractérisation du matériau initial pour connaître la composition et la nature de ses constituants (selon EN 13432). La norme établit une teneur minimale de solides volatils organiques (50%), des teneurs maximales en métaux lourds et de fluor dans le matériau initial, ainsi que la quantité de produits chimiques organiques (ADEME et al., 2020).
- Désintégration (selon ISO 16929) : vérification de l'aptitude du produit à se désintégrer au bout de 12 semaines pour le compost industriel et à 6 mois pour le compost domestique, *i.e.* la moitié de la durée maximale de biodégradation. La norme établit un seuil de refus de 10% de la masse initiale au-dessus du tamis de 2 mm (ADEME et al., 2020).
- Biodégradabilité (selon ISO 14855 : 1999) : vérification de l'aptitude du produit à être bioassimilé, *i.e.* minéralisé, par les micro-organismes du milieu en conditions aérobies ou anaérobies. La norme établit un seuil acceptable de biodégradabilité d'au moins 90% au total, ou de 90% de la dégradation maximale d'un matériau de référence en moins de 6 mois (ADEME et al., 2020).
- Qualité du compost/milieu final (selon OCDE 208), via sa caractérisation et des tests d'écotoxicité. La qualité du milieu ne doit pas être altérée par la biodégradation des matériaux. La norme impose de réaliser des tests écotoxicologiques (*i.e.* daphnies, algues, vers, etc.) sur le milieu final ainsi que des performances de qualité supérieure à 90% de celle du milieu témoin correspondant (ADEME et al., 2020).

### 1.3.2. Les réglementations spécifiques aux additifs plastiques

Différentes restrictions, ciblant certaines molécules, ont été mises en place dans l'UE, la plupart sont regroupées dans le **Tableau 4**. Par exemple, certains phtalates, nonylphénols, PBDEs et l'HBCD, sont interdits ou bien soumis à des restrictions et/ou à des procédures de surveillance et d'évaluation de risques selon la réglementation REACH. D'autres molécules utilisées comme additifs plastiques (*e.g.* HBCDs, PBDEs, nonylphénols, DEHP) ont été incluses en tant que substances prioritaires sous la Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC) (Parlement Européen, 2001) et des normes de qualité environnementale à l'échelle européenne ont été fixées (2008/105/EC; 2013/39/EU). Cependant, aucune législation ne s'applique pour certaines molécules (*e.g.* TBBPA) et il manque encore des seuils de sécurité environnementale et sanitaire pour de nombreuses molécules (*e.g.* certains retardateurs de flamme phosphorés et les bisphénols B, F et S) (Vandermeersch et al., 2015). De plus, la réglementation REACH ne couvre pas tous les produits et les substances utilisées dans les MCDA produites en Europe, car, comme précédemment énoncé, les MCDA ont leur propre réglementation (*i.e.* Règlement No 10/2011/EU 2011). De ce fait, certains produits limités par REACH sont toujours autorisés pour utilisation dans les MCDA (Groh et al., 2019).

Plus récemment, la Commission européenne a adopté la « stratégie de l'UE pour la durabilité dans le domaine des produits chimiques » le 14 octobre 2020 (European Commission, 2020). Cette stratégie prévoit d'interdire progressivement l'utilisation de plusieurs milliers de substances chimiques nocives dans divers produits de consommation (les jouets, les articles de puériculture, les cosmétiques, les matériaux en contact avec des denrées alimentaires et les textiles) (European Commission, 2022). Six familles de substances et un type de polymère sont pour l'instant concernés : les plastiques en PVC ainsi que l'intégralité des retardateurs de flamme, des bisphénols et les substances fréquemment liées au développement de cancer tels que les substances per- et polyfluoroalkylées et les phtalates. Ce plan cible des familles entières de composés largement utilisés dans des secteurs industriels très divers, ce qui va engendrer beaucoup de changements au niveau de l'industrie pétrochimique. Ce processus d'interdiction devrait débuter dans les années à venir pour aboutir à une interdiction totale en 2030.



**Tableau 4 : Mesures et réglementations pour certains additifs plastiques organiques majoritairement utilisés.**

Molécules	Législations	Références
<b>Antioxydants</b>		
<b>4-NP et 4-t-OP</b>	Substance dangereuse prioritaire pour les eaux de surfaces (Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC))	[1]
<b>NPs et dérivés éthoxylés</b>	Production et utilisation interdites dans l'UE (Règlement (CE) N° 1223/2009)	[2]
<b>Bisphénol A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UE : Utilisation interdite dans les biberons pour nourrissons depuis le 1<sup>er</sup> juin 2011 (Règlement (EU) No 321/2011).</li> <li>• Au plus tard le 12 janvier 2022, les États membres doivent prendre les mesures nécessaires pour garantir que les eaux destinées à la consommation humaine respectent le seuil de 2,5 µg/L (Loi n° 2012-1442)</li> <li>• En France : après une interdiction, réautorisation du BPA avec des limites de migration spécifiques plus strictes (à 0,05 mg/kg) ((EU) No 2018/213)</li> </ul>	[3] ; [4] ; [5]
<b>Bisphénol F</b>	En France : utilisation interdite dans tous les MCDA	[6]
<b>Plastifiants (phtalates)</b>		
<b>DMP, DEP, DEHP, DBP, DiBP, BBP, DnOP</b>	Inclus comme substance dangereuse prioritaire pour les eaux de surfaces et la santé (Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC))	[1] ; [7]
<b>DEHP, DBP, BBP et DIBP</b>	Changement de la limite de concentration dans les MCDA, réduction à 0,1% en masse m/m (Règlement (EU) No 2018/2005)	[8]
<b>DINP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interdit dans les articles pour les enfants (Directive 2005/84 EC)</li> <li>• Interdit dans les MCDA</li> </ul>	[9] ; [10] ; [11]
<b>DBP, BBP, DEHP, DIDP</b>	Interdit dans les MCDA destinées à être en contact avec des matières grasses (Règlement (EU) No 321/2011).	[3]
<b>Retardateurs de flamme</b>		
<b>penta-, octa- et deca- BDEs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recommandations de niveaux de concentration maximums dans les matériaux plastiques pour garantir la sécurité sanitaire</li> <li>• Inclus comme substance dangereuse prioritaire pour les eaux de surfaces (Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC))</li> <li>• Interdit en UE depuis 2004 et 2009</li> </ul>	[1] ; [12] ; [13]
<b>Tetra- à hepta- BDEs</b>	Parmi les produits à bannir dans la convention de Stockholm sur les POPs	[14]
<b>Penta- à octa- BDEs</b>	Notification de 90 jours avant import et production	[15]
<b>HBCD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inclus comme substance dangereuse prioritaire pour les eaux de surfaces (Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC))</li> <li>• Parmi les produits à bannir dans la convention de Stockholm sur les POPs</li> </ul>	[1] ; [16] ; [17]
<b>TBBPA</b>	Aucune restriction (dans le monde), bien que cette molécule soit incluse dans les listes de substances prioritaires	[18] ; [19]
POPs = Polluants Organiques Persistants <b>Références</b> : [1] : (Parlement Européen, 2001) ; [2] : (European Commission, 2009) ; [3] : (European Commission, 2011a) ; [4] : (Journal officiel, 2012) ; [5] : (European Commission, 2018b) ; [6] : (INERIS, 2014) ; [7] : (Ventrice et al., 2013) ; [8] : (European Commission, 2018c) ; [9] : (European Commission, 2005a) ; [10] : (European Commission, 2003b) ; [11] : (Boberg et al., 2011) ; [12] : (European Commission, 2003a) ; [13] : (La Guardia et al., 2006) ; [14] : (Convention de Stockholm, 2017a) ; [15] : (USEPA, 2012) ; [16] : (Convention de Stockholm, 2017b) ; [17] : (EFSA et al., 2020) ; [18] : (BSEF) ; [19] : (Vandermeersch et al., 2015).		

#### 1.4. Une fin de vie problématique – gestion des déchets plastiques

Après leur utilisation, les matériaux plastiques peuvent avoir six destins différents. Ils peuvent être mis en décharge à ciel ouvert, enfouis, incinérés pour produire de l'énergie, recyclés, mis en compost industriel ou domestique ou bien sortir des chemins de gestion officiels et se retrouver dans l'environnement et éventuellement atteindre les milieux aquatiques. Depuis la création du premier plastique synthétique, on estime qu'un total de 8300 Mt de plastique a été produit, dont environ 79% ont été déposés ou abandonnés dans l'environnement (Geyer et al., 2017).

Avec l'augmentation de la production et de l'utilisation de matière plastique, la gestion des déchets plastiques reste inadéquate voire inexistante dans de nombreux pays. Dans l'UE, 29,1 millions de tonnes de déchets plastiques ont été générés et collectés en 2018, ce chiffre ne prenant pas en compte les déchets non recensés qui se sont retrouvés dans l'environnement. Les emballages comptent pour 62,2% des déchets plastiques et sont actuellement les produits les moins recyclés. Sur le total de déchets collectés, seulement 32,5% ont été recyclés, 42,6% ont été incinérés pour être revalorisés en récupérant de l'énergie, et 24,9% ont été mis en décharge (Li et al., 2022; PlasticEurope, 2020). Entre 2006 et 2016, une augmentation de moyens mis en place a été observée engendrant une augmentation de 11% de la collecte de déchets ainsi que du recyclage qui a augmenté de 79%, passant de 4,7 à 8,6 millions de tonnes de plastiques recyclés. La valorisation énergétique par l'incinération a augmenté de 61% et la mise en décharge a diminué de 43% (Plastic Europe, 2019). En France, en 2021, le taux de recyclage était de 30% pour les emballages plastiques et de 59% pour les bouteilles et flacons en plastique (CITEO, 2022). Ces chiffres devraient aller en augmentant du fait des désirs des consommateurs pour des produits plus durables et des changements récents dans la législation. L'UE a mis en place un plan d'action pour privilégier un plan davantage circulaire en augmentant le recyclage. La loi AGEC (loi Anti-Gaspillage pour une Economie Circulaire), mise en place en 2020, cherche à tendre vers un objectif de 100% de plastique recyclé d'ici 2025 et la fin de la commercialisation d'emballages plastiques à usage unique d'ici à 2040 (Journal officiel, 2020).

Dans les paragraphes suivants un focus est fait sur le recyclage, puisque ce processus soulève des questions relatives à la complexité des matériaux plastiques, notamment concernant les additifs plastiques et la sécurité sanitaire des matériaux recyclés.

La majorité des déchets plastiques sont recyclés suivant la voie dite « mécanique ». Les déchets sont triés, lavés, broyés, extrudés et transformés sous forme de granulés, sans modifier la matière première. Cette technique est la plus répandue mais comprend plusieurs limites :

- La diversité des résines (polymères, formulations) et de leurs usages rend le recyclage plus complexe.

En effet, la première étape de tri des déchets, permettant de regrouper les déchets suivant leur nature chimique, est indispensable bien que longue et fastidieuse. Aujourd'hui, plusieurs technologies de tri automatique (basées sur la gravité, la triboélectricité, la spectrométrie proche infrarouge spectral) sont disponibles et permettent un tri plus efficace et plus rapide (Taneepanichskul et al., 2022). La nécessité de cette étape de tri met aussi en avant une des limites du recyclage qui est la nécessité de séparer les déchets façonnés avec un même polymère mais d'usage différent, qui ne peuvent pas être mélangés du fait de l'impossibilité de recycler un mélange de polymères. De la même façon, les matériaux multi-polymères comme les emballages multicouches, ne peuvent pas être recyclés par recyclage mécanique en raison de l'incompatibilité chimique des différentes couches (Walker et al.). Le recyclage mécanique ne débarrasse pas non plus les matériaux de leur pollution chimique notamment de leurs additifs souvent toxiques. De plus, la diversité des produits collectés et des formulations, et donc des additifs, empêche souvent le recyclage en boucle fermée (*i.e.* la réutilisation d'un matériau recyclé pour son application d'origine) (Académie des sciences, 2021).

- La dégradation des propriétés des matériaux suite au recyclage mécanique.

Après la transformation, les propriétés de la matière plastique sont dégradées, les matériaux recyclés, dits secondaires, ont alors des performances techniques et une valeur économique plus faibles (Geyer et al., 2017). De ce fait, il est fréquent que la matière obtenue ne soit plus utilisée pour la même application, ou qu'elle doive intégrer une part de résine neuve (*i.e.* au minimum 75%) afin d'être pourvue d'une qualité similaire (Nait-Ali, 2008). Cette pratique est utilisée dans le recyclage des bouteilles en PET ainsi que pour la fabrication de bouteilles ou packaging alimentaires multicouches comprenant une couche de film en polymère recyclée et les couches de surfaces en polymères vierges. L'altération des propriétés des matériaux post recyclage induit souvent un ajout d'additifs dans le but de récupérer les propriétés désirées du matériau ou d'homogénéiser le matériau recyclé. Cela augmente généralement le coût des plastiques recyclés, complique les futures tentatives de recyclage de ces matériaux et interroge quant à l'innocuité des matériaux recyclés (Académie des sciences, 2021; Li et al., 2022). La composition et la sécurité sanitaire d'un plastique recyclé seront d'autant plus compliquées à évaluer. Par ailleurs, des réactions secondaires peuvent se produire lors du recyclage des matériaux. On obtient alors un

produit secondaire avec des quantités d'additifs ou de NIAS inconnues qui augmentent la complexité du plastique initial et la complexité des réactions secondaires durant le recyclage.

Le recyclage chimique, quant à lui, est complémentaire au recyclage mécanique. Il va permettre de produire un polymère réutilisable en boucle fermée et de qualité équivalente, quel que soit le nombre de cycles de recyclage, ce qui permet une vraie circularité. La technique consiste à reconvertir les polymères en matières premières (monomères) secondaires, tout en les purifiant des produits chimiques (additifs), pour les réintroduire ensuite à différentes étapes du processus de production du plastique. Cette méthode est au point pour le PET, mais la dépolymérisation de certains polymères comme le PE et le PP reste encore un défi (Académie des sciences, 2021; Davidson et al., 2021; Ragaert et al., 2017; UNEP, 2021). La recherche s'axe sur l'amélioration des méthodes de recyclage chimique pour les déchets plastiques mixtes, évitant ainsi la nécessité d'un tri (Solis and Silveira, 2020). Cependant le recyclage chimique représente une très faible part (environ 1%) dans les techniques de recyclage et est uniquement appliqué dans les pays développés. Cela est notamment dû au coût énergétique très élevé de cette technique et à la nécessité d'une expertise spécifique (UNEP, 2021).

Il est important de s'intéresser aux inégalités de gestion et de traitement des déchets plastiques entre les pays. Bien que cette gestion soit complexe et incomplète, la plupart des pays développés ont mis en place des schémas et des infrastructures de traitement des déchets sophistiqués, souvent coûteux, que les pays en voie de développement ne peuvent pas acquérir et où la gestion des déchets reste défailante. Par exemple en Allemagne le taux de plastiques jetés en décharge est de 0,6% alors qu'il s'élève à 90% dans les pays en voie de développement (Hoorweg et al., 2013; PlasticEurope, 2020; Thiam and Fall, 2021). De la même façon, Jambeck et al. (2015) ont estimé que la moitié des déchets plastiques qui arrivent dans l'environnement provenaient de 5 pays sur 192 uniquement (*e.g.* la Chine, le Vietnam, les Philippines, l'Indonésie et le Sri Lanka). Ceci s'explique en partie par le fait que de nombreux pays développés (*e.g.* les États-Unis et l'UE) ont longtemps expédié leurs déchets vers des pays sous-développés, notamment en Asie, où les systèmes de gestion des déchets sont déjà fragiles (Browning et al., 2021).

Bien que des efforts et des améliorations aient déjà été mis en place concernant la collecte et le traitement des déchets plastiques, la pollution aquatique par les plastiques ne diminue pas et souligne de fait, que ces mesures sont actuellement insuffisantes pour réduire les rejets dans l'environnement. Dans le milieu aquatique, la pollution plastique représente environ 75% des déchets marins (Napper and Thompson, 2020). Pourtant, si les moyens dont on dispose aujourd'hui étaient mis en place de manière concertée et à l'échelle globale, il serait possible de diminuer significativement la pollution plastique (Lau et al., 2020).

## 2. Les plastiques et microplastiques dans l'environnement

### 2.1. La pollution plastique

La présence de plastique dans l'environnement provient aussi bien des activités terrestres (Andrady, 2011), que marines (Bucci et al., 2020; Pham et al., 2014). Elle peut être due à des rejets industriels, des déversements d'effluents de sortie de station d'épuration (STEP) contenant des microparticules de plastiques non retenues par les systèmes de filtration (Carr et al., 2016), des rejets accidentels non-intentionnels lors de débordement d'eau des STEP lors d'événements extrêmes (tempêtes, inondations) ou suite à des problèmes de transports et de stockage, ou encore de déversements illégaux dans l'environnement (Gregory, 1978). Les activités humaines telles que la pêche, l'aquaculture, les activités de loisirs, la présence de bateaux ou de constructions navales sont aussi des sources importantes de plastiques dans le milieu marin (Gerigny et al., 2018; Lusher et al., 2020; Xue et al., 2020). (Figure 2)

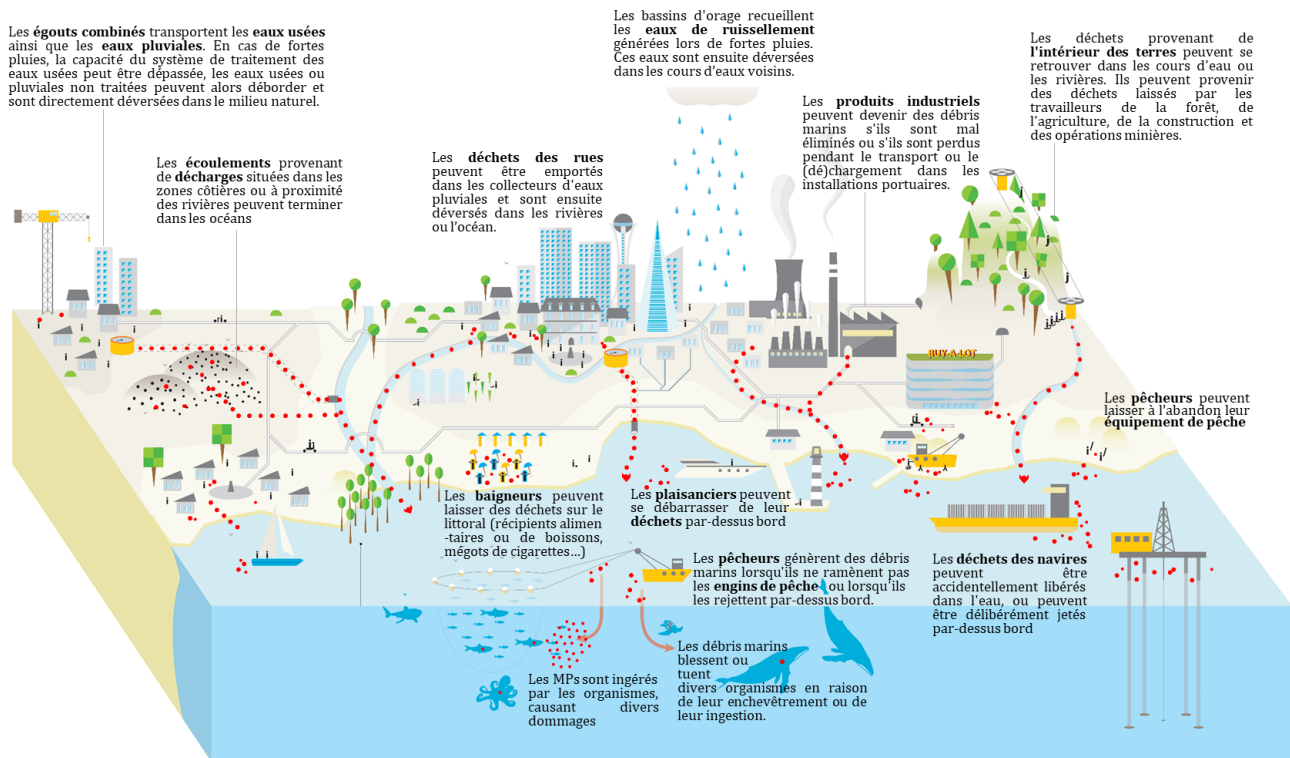


Figure 2 : Sources et transport des déchets plastiques vers l'océan. (Adapté de Marine litter vital graphics 2016© Maphoto/Ricardo Pravettoni. Accessible sur : <https://www.grida.no/resources/6922> <https://www.grida.no/resources/6922>)

Si elle n'est pas directe, l'entrée de plastiques et particules de plastiques dans l'océan se fait par différentes voies : les dépôts atmosphériques, le vent, l'entraînement de micro- et nanoplastiques par les eaux de ruissellement, vers les eaux intérieures puis le milieu marin qui est le milieu récepteur (Académie des sciences, 2021; Dris et al., 2016; Lusher et al., 2017). L'estimation du total des déchets

plastiques arrivant dans l'océan se situe entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes (Jambeck et al., 2015), ou encore de 0,41 à 4 Mt (Schmidt et al., 2017). Ces estimations, obtenues à partir de travaux de modélisation, sont régulièrement débattues du fait de leurs grandes incertitudes et ont été récemment revues à la baisse (Weiss et al., 2021). On estime à 24 400 milliards le nombre de particules flottantes à la surface des océans pour une masse totale se situant entre 82 000 et 578 000 tonnes (Isobe et al., 2021). Dans ces chiffres, les plastiques à usage unique (comme les couverts, les contenants alimentaires, les bouteilles et bouchons, les pailles, les cotons-tiges et les filtres de cigarette) représentent 50% de cette pollution plastique. Les barquettes alimentaires et les bouteilles font partie des cinq types de déchets les plus retrouvés (Earth Watch, 2018; Gerigny et al., 2018). Le PE, le PP, le PSE et le PET sont les polymères plastiques majoritairement retrouvés dans l'environnement marin (Heo et al., 2013; Caizhi Zhou et al., 2011). De plus, les tailles des plastiques retrouvés sont très diverses.

Hormis les microparticules plastiques de source primaire, qui entrent déjà dans l'environnement à l'état de micro- ou nanoplastiques, une fois dans l'environnement, divers processus physicochimiques (cf. partie 2.2) vont mener à la fragmentation des déchets plastiques. Ils pourront alors être catégorisés selon leurs tailles : les macroplastiques (généralement définis comme des particules d'une taille > 20 mm de diamètre), les mésoplastiques (tailles comprises entre 5 et 20 mm), les microplastiques (particules de tailles comprises entre 1 et 5000  $\mu\text{m}$ ), et les nanoplastiques (NPs) (particules de tailles comprises entre 1 et 1000 nm) (Franzellitti et al., 2019; Gigault et al., 2018; Hartmann et al., 2019). Il est cependant important de mentionner que le concept de taille des MPs manque de clarté puisque la définition de limites hautes et basses des tailles des MPs diffère selon les études (**Figure 3**) (GESAMP, 2015; Hartmann et al., 2019). En effet, certaines études vont mentionner une limite haute de 5 mm sans limite inférieure (Thompson et al., 2004), une limite haute de 1 mm (Browne et al., 2011; Wright and Kelly, 2017) ou bien, en fonction des auteurs, des limites basses fixées à 0,1 ou 1  $\mu\text{m}$  (GESAMP, 2015; Gigault et al., 2018; Lusher et al., 2017).

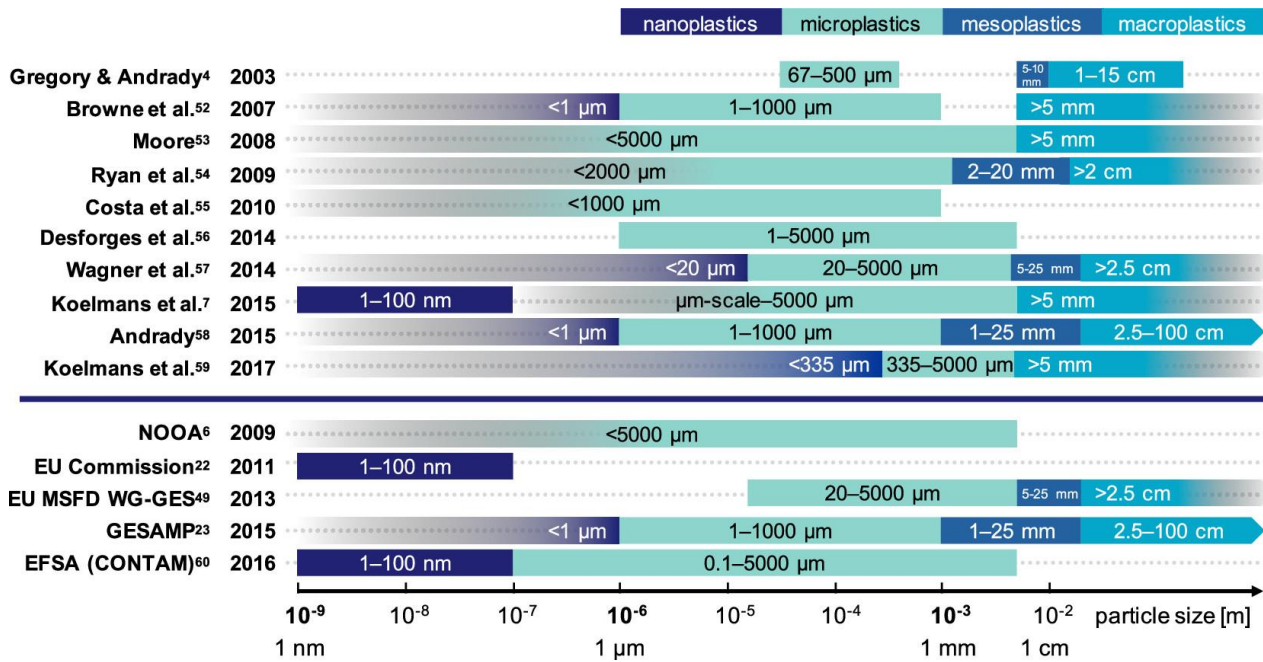
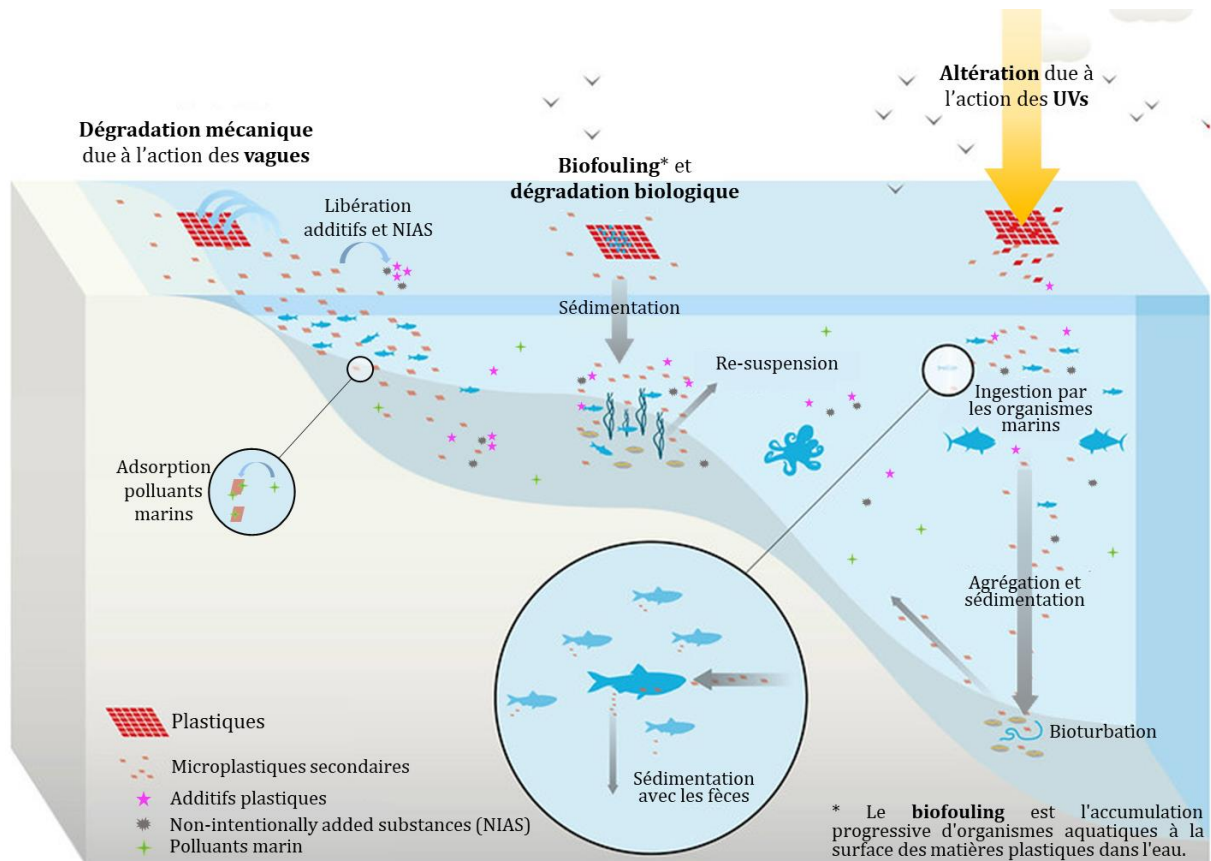


Figure 3 : Exemples des différentes catégorisations des débris plastiques en fonction de leur taille, définies dans la littérature. Il convient de noter qu'il ne s'agit pas d'un aperçu exhaustif de toutes les classes de taille utilisées. (Issu de Hartmann et al., 2019)

Les MPs peuvent provenir de deux sources : primaire et secondaire. Les MPs de source primaire sont des particules fabriquées directement avec des tailles inférieures à 5 mm et correspondent aux granulés de matières premières (Cole et al., 2011) ou bien aux microbilles utilisées dans les domaines de l'industrie, des produits cosmétiques et sanitaires ; soit des particules qui arrivent dans l'environnement déjà sous forme microscopiques, *e.g.* pneus et fibres (Chang, 2013; Chang, 2015; Lusher et al., 2017). En France, les microbilles de plastiques sont interdites dans les cosmétiques depuis 2018 (Journal officiel, 2017). Les fibres textiles synthétiques ainsi que les fragments de pneu peuvent aussi être considérées comme source primaire de MPs dans l'environnement (Cesa et al., 2017; Hermabessiere, 2018). Les MPs de source secondaire sont issus de la dégradation et de la fragmentation de macro déchets plastiques dans l'environnement. Ces phénomènes seront abordés dans la partie suivante (Cf. partie 2.2).

## 2.2. Le devenir des déchets plastiques dans les océans

Dans l'environnement, les déchets marins vont avoir plusieurs destinées. La **Figure 4** illustre le devenir des déchets plastiques après leur entrée dans l'océan, depuis leur dégradation jusqu'à leurs potentiels impacts sur les organismes vivants.



**Figure 4 : Devenir des déchets plastiques dans le milieu marin. (Adapté de Marine litter vital graphics © Maphoto/Riccardo Pravettoni. Accessible sur : <https://www.grida.no/resources/6911>)**

Une fois dans le milieu marin, les macro-déchets vont s'accumuler, interagir avec le milieu environnant et pourront avoir un effet néfaste sur les organismes marins, *i.e.* suffocation, étranglement (Wright et al., 2013). Le devenir des déchets plastiques de toutes tailles, *i.e.* distribution et dégradation, n'est pas entièrement élucidé car il est influencé par de nombreux facteurs : propriétés physicochimiques dépendantes des polymères, conditions environnementales et phénomènes biologiques tels que le « biofouling » ou la biodégradation (Lagarde et al., 2016; Long et al., 2015; Zettler et al., 2013). Exposés à différentes contraintes environnementales, les macro-déchets vont se dégrader plus ou moins lentement, sous l'action de divers mécanismes physico-chimiques comme des stress mécaniques issus de l'action de courants, des vagues, l'abrasion par le sable et le vent (Andrady, 2011; Lambert and Wagner, 2016; Ter Halle et al., 2016), et des stress chimiques notamment



provoqués par les rayonnements UVs (Ryan et al., 2009; Singh and Sharma, 2008). La photodégradation par les UVs est la cause principale de la dégradation des plastiques dans l'environnement (Barnes et al., 2009). Outre ces phénomènes physico-chimiques, des phénomènes biologiques peuvent causer la dégradation des plastiques dans le milieu marin. Cette biodégradation est souvent effectuée par l'action de bactéries (Yoshida et al., 2016).

Ces phénomènes de dégradations vont induire la fragmentation des déchets plastiques en de petites particules appelées micro- ou nanoplastiques. A leur tour, les MPs produits vont avoir plusieurs devenir et leur toxicité va se jouer sur différents impacts : (i) les impacts physiques liés à l'ingestion des particules de MPs, (ii) les impacts biologiques, liés à la colonisation de microorganismes à la surface des MPs, puis, les impacts chimiques liés (iii) à l'adsorption de contaminants chimiques issus de l'environnement ou (iv) au relargage des additifs chimiques incorporés dans le plastique pendant la fabrication, *i.e.* additifs. **(Figure 4)** Ces points seront traités en terminant sur l'aspect (iv), le plus intéressant pour notre étude.

### 2.2.1. Les MPs comme contaminants physiques

La petite taille des MPs leur permet d'être ingérés par de nombreuses espèces marines (de Sá et al., 2018). L'ingestion et les impacts des MPs ont largement été documentés sur plusieurs centaines d'espèces marines (Franzellitti et al., 2019; GESAMP, 2015) du phytoplancton jusqu'aux mammifères marins (Hermabessiere, 2018; Lusher et al., 2017).

L'ingestion de MPs par les organismes peut être directe (ingestion de MPs présents dans l'eau ou les sédiments), ou indirecte (ingestion via des proies contaminées ou transfert trophique) (Au et al., 2017; Farrell and Nelson, 2013; Murray and Cowie, 2011; Ory et al., 2017; Welden et al., 2018). Plusieurs études ont montré qu'un certain nombre d'espèces sont incapables de faire la distinction entre les MPs et leurs proies et ingèrent alors par erreur des MPs (Ory et al., 2017; Welden et al., 2018). Au niveau des impacts de l'ingestion de ces microparticules de plastiques, des études ont recensé des impacts à différentes échelles d'intégration biologiques : subcellulaires, physiologiques ou comportementales. Par exemple, sur le phytoplancton, des auteurs ont mentionné une diminution de la biomasse et de la croissance (Green et al., 2016; Sjollema et al., 2016) ainsi qu'une diminution de la photosynthèse (Bhattacharya et al., 2010). Le zooplancton est lui aussi impacté. L'exposition aux MPs et NPs diminue leur prise alimentaire et leur fécondité (Lee et al., 2013). Les phyto- et zooplanctons étant tous deux un maillon essentiel et à la base de la chaîne trophique, une contamination en microparticules de plastique peut avoir des répercussions sur la chaîne trophique entière (Franzellitti et al., 2019).

Chez les bivalves filtreurs, tels que la moule et l'huître, des études en laboratoire ont observé des ingestions et temps de rétention des MPs qui seraient liés aux caractéristiques physiques des microparticules, *i.e.* forme (sphères ou fibres) et taille (Van Cauwenberghe et al., 2015; Wang et al., 2021; Ward et al., 2019). Ces organismes étant des bivalves filtreurs sélectifs, ils n'ingèrent que des algues et des particules de taille et de forme appropriées (ingestion préférentielle entre 20 et 200  $\mu\text{m}$ ) et auraient tendance à rejeter les plus grosses particules par le biais de pseudofèces (Browne et al., 2008; Van Cauwenberghe et al., 2015; von Moos et al., 2012; Ward and Kach, 2009; Ward et al., 2019). Cependant, la corrélation entre la taille des particules de plastique et l'excrétion des bivalves est inconnue (Wang et al., 2021) bien que le passage de nanoplastiques à travers la barrière intestinale ainsi que le transfert vers le système circulatoire et l'accumulation vers d'autres tissus aient été démontrés (respectivement par (Vagner et al., 2022) et (Al-Sid-Cheikh et al., 2018)). L'ingestion des MPs est aussi dépendante de leurs caractéristiques de surface (*i.e.* charge de surface, la mouillabilité, revêtement) (Ward et al., 2019). Après ingestion de microparticules, une accumulation de ces particules a été observée dans le système digestif, les branchies et dans le manteau de la moule (Wang et al., 2021). Même un simple transit des MPs dans le tractus digestif peut entraîner des effets délétères comme observé en laboratoire avec des perturbations sur l'intégrité des membranes (von Moos et al., 2012), le déclenchement d'une réponse immunitaire ou encore des effets délétères sur la filtration et la prise alimentaire (Wegner et al., 2012). Des effets similaires, comportementaux, de filtration et alimentation ont aussi été observés chez l'huître, avec en prime, des impacts sur le succès reproducteur (Sussarellu et al., 2016).

Chez le poisson, malgré une observation d'une évacuation partielle (de 50 à 90%) des MPs au bout de 10 à 33 heures, des effets délétères ont malgré tout été observés. de Sá et al. (2015) ont communiqué un effet de diminution de l'efficacité de prédation chez le gobie, ainsi qu'une détérioration des membranes et des fonctions de l'intestin. Pedà et al. (2016) quant à eux, ont observé un stress oxydatif chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Aux perturbations déjà mentionnées peuvent aussi s'ajouter une diminution et confusion de la prise alimentaire, une diminution de la croissance, du taux de lipides de réserve, de la production d'œufs, observés chez différentes espèces (Ory et al., 2017; Watts et al., 2015; Welden and Cowie, 2016). La liste des impacts des particules de MPs sur différentes espèces est extrêmement longue et il est difficile d'être exhaustif. Devant la multitude de données et d'études caractérisant la toxicité des MPs, une équipe de recherche a récemment mis en ligne une base de données en libre accès (Toxicity of Microplastics Explorer ; [ToMEx](https://microplastics.sccwrp.org/)), fournie et dynamique, permettant de rechercher, visualiser, analyser et télécharger des données sur la toxicité des MPs (Thornton Hampton et al., 2022) (base de données accessible *via* <https://microplastics.sccwrp.org/>).

### 2.2.2. Les MPs comme vecteur de contaminants biologiques

Les MPs peuvent jouer le rôle de « radeau » et être colonisés, dans le cadre de biofouling, par divers organismes incluant des arthropodes, des algues, et plus particulièrement des microorganismes tels que des bactéries (Zettler et al., 2013) formant un biofilm complexe à la surface de la particule de plastique. Ce biofilm, appelé « plastisphère » peut avoir des conséquences sur l'environnement comme le transport et la dissémination d'espèces exotiques et potentiellement nuisibles (Carlton et al., 2017), ainsi que le développement et le transport de souches potentiellement pathogènes vers les écosystèmes et les espèces marines (Barnes, 2002; Barrick et al., 2021). A ce titre, différentes études ont montré la présence d'un biofilm de bactéries potentiellement pathogènes du genre *Vibrio* à la surface de MPs collectés en mer (Altekruse et al., 2000; Frère et al., 2018; Kirstein et al., 2016; Zettler et al., 2013). Des bactéries pathogènes pour l'Homme ont été détectées sur des microplastiques alors qu'elles étaient peu ou pas présentes dans l'eau de mer environnante, comme illustré par des travaux réalisés sur les côtes belges (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Stenotrophomonas maltophilia*) et brésiliennes (*Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* et *V. mimicus*) (McCormick et al., 2014; Silva et al., 2019), ce qui interroge sur le transfert d'agents pathogènes humains vers des espèces d'intérêt alimentaire comme les mollusques bivalves (huîtres et moules) via notamment l'ingestion de MPs contaminés.

En plus d'être des contaminants « physiques » et « biologiques » les particules de MPs sont associées à différentes molécules chimiques, soit adsorbées à leur surface et provenant initialement de l'environnement dans le cadre d'un milieu pollué, soit ajoutées au sein des plastique lors de leur fabrication (Rochman, 2015). De ce fait, les MPs peuvent agir comme un puits, un vecteur et une source de contaminants organiques et inorganiques dans l'environnement (Bakir et al., 2014; Engler, 2012; Hirai et al., 2011; Emma L Teuten et al., 2009).

### 2.2.3. Les MPs comme vecteur de contaminants chimiques

Une fois dans l'environnement marin, du fait de leur caractère hydrophobe, les particules de plastiques peuvent adsorber et concentrer à leur surface des produits chimiques hydrophobes présents dans le milieu, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les PBDE, les phtalates, divers pesticides organochlorés, des produits pharmaceutiques, ainsi que des métaux lourds (Atugoda et al., 2021; Engler, 2012; Hartmann et al., 2019; Mato et al., 2001; Naik et al., 2019). Ces substances (PCBs, HAPs, PBDEs, métaux) sont des substances toxiques, persistantes et bioaccumulables (Mato et al., 2001; Rochman, 2015; Teuten et al., 2007; Thompson et al., 2004). Les contaminants organiques, hydrophobes, ont même tendance à s'adsorber préférentiellement sur les polymères en raison de leur caractère hydrophobe, plutôt que

sur les sédiments ; si bien que les concentrations retrouvées à la surface des MPs sont généralement plus élevées que les niveaux mesurés dans l'environnement (Académie des sciences, 2021; Mato et al., 2001; Teuten et al., 2007). Après l'étude de différents articles scientifiques, Lee and Kim (2015) ont compilés les quantités de PBDEs mesurées dans différentes matrices environnementales et ont observé que les concentrations en PBDEs étaient plus faibles dans les eaux contenant des concentrations importantes en MPs. Cela suggère une réadsorption des PBDEs dans l'environnement à la surface des débris plastiques. Les MPs sont même utilisés en tant qu'échantillonneurs passifs pour les contaminants organiques dangereux, en anglais Hazardous Organic Contaminants (HOCs), du fait de leur forte affinité avec ces derniers (Takada, 2006).

La nature du polymère plastique va aussi jouer sur la capacité d'adsorption des contaminants organiques hydrophobes. En effet, diverses études se sont penchées sur ce phénomène et l'affinité des contaminants organiques hydrophobes varie selon les polymères, une affinité plus grande a été observée pour le PE, suivie par le PP, puis le PVC et le PS (O'Connor et al., 2016). Leur comportement et donc leur impact seront donc différents (Karapanagioti and Klontza, 2008; Mato et al., 2001).

Des études en laboratoire ont étudié le transfert, la toxicité et l'accumulation de HOCs via l'ingestion de MPs contaminés chez plusieurs organismes marins tels que les poissons (Oliveira et al., 2013; Rochman et al., 2013), la moule (Avio et al., 2015; Paul-Pont et al., 2018) et d'autres organismes tels que les vers (Browne et al., 2013). Bakir et al. (2014) a observé une désorption accélérée de HOCs adsorbés sur des MPs de PVC et PE dans des conditions intestinales stimulées. Ces études démontrent la possibilité d'un transport et d'une accumulation de HOCs adsorbés sur des MPs via l'ingestion. A contrario, d'autres études parlent d'une surestimation de l'implication des MPs sur la contamination des organismes par les HOCs, qui ne seraient pas les vecteurs majoritaires et ne contribueraient que très peu à l'accumulation des HOCs chez les organismes au regard de la faible proportion relative des MPs vis-à-vis d'autres vecteurs particuliers tels que les sédiments, la matière en suspension, les colloïdes, etc. (Besseling et al., 2017; Herzke et al., 2016; Paul-Pont et al., 2018). Des études de modélisation sont aussi arrivées à la même conclusion (Bakir et al., 2016; Gouin et al., 2011; Koelmans et al., 2013). Dans le même sens, (Koelmans et al., 2016) aurait même observé, dans son étude de modélisation, un effet de dépurification de l'ingestion de MPs.

Si les polluants adsorbés à la surface des MPs ne sont qu'une source mineure de contamination de composés toxiques vers l'environnement et les organismes, les additifs plastiques, dont certains sont aussi classifiés comme HOCs, peuvent quant à eux jouer un rôle important dans la toxicité des MPs. Etant introduits volontairement lors de la formulation de plastiques, ils sont une source supplémentaire de contaminants chimiques dans le milieu marin et pour les organismes (Al-Odaini et al., 2015).

#### 2.2.4. Les MPs comme source d'additifs dans l'environnement

Comme mentionné précédemment, les additifs, généralement non liés chimiquement aux polymères, peuvent migrer du polymère (Andrady, 2011; Net et al., 2015; Oehlmann et al., 2009) et être relargués, notamment au fur et à mesure de la dégradation des particules de plastiques (Rice and Gold, 1984). Ils peuvent alors être libérés dans l'environnement et/ou au sein d'un organisme après ingestion de MPs. Selon Suhrhoff and Scholz-Böttcher (2016) entre 35 à 917 tonnes d'additifs plastiques seraient libérés dans l'océan chaque année. La plupart de ces additifs peuvent s'accumuler dans les organismes (Yang et al., 2021) et une biomagnification peut potentiellement avoir lieu le long de la chaîne trophique (Diepens and Koelmans, 2018).

Le transfert et la toxicité des additifs après ingestion de MPs ont déjà été démontrés par des études en laboratoire (Bakir et al., 2014; Browne et al., 2013; Chua et al., 2014; Gaylor et al., 2012; Rochman et al., 2013; Wardrop et al., 2016). D'autres études, sur le terrain, ont démontré le transfert de PBDEs chez le puffin à bec grêle (*Puffinus tenuirostris*) après ingestion de débris de plastiques (Tanaka et al., 2013; Tanaka et al., 2015). L'étude de Gassel et al. (2013) a mis en évidence une corrélation entre la présence de NPs et de PBDEs dans les tissus de poissons et l'ingestion de plastiques. Cette corrélation entre ingestion de plastiques et contamination des organismes en additifs a amené à considérer certains additifs plastiques (BDE-209 et DEHP) comme des proxys, *i.e* des marqueurs de l'ingestion de débris plastiques (Fossi et al., 2014; Fossi et al., 2016; Rochman et al., 2014). De plus, différentes études ont montré la présence d'additifs plastiques dans l'environnement marin (eaux et sédiments), dans les MPs échantillonnés dans l'environnement ainsi que dans les organismes marins. Une review complète sur le sujet a été publiée en 2017 par Hermabessiere et al. (2017).

L'étude des MPs retrouvés dans l'environnement marin (océans ou plages) a permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés utilisés comme additifs plastiques dans la quasi-totalité des fragments plastiques retrouvés (Faure et al., 2015; Fries et al., 2013; Gauquie et al., 2015; Hirai et al., 2011; León et al., 2019; Mato et al., 2001; Rani et al., 2015; Rochman et al., 2014), indiquant alors leur implication dans la présence de ces mêmes molécules dans les eaux et sédiments. Parmi les additifs, les retardateurs de flamme bromés (PBDEs, HBCDs, BTBPE, TBBPA), les phtalates (notamment le DEHP), BPA et les nonylphénols (notamment le 4-Nonylphénol) sont les additifs plastiques les plus retrouvés dans l'environnement marin et les plus étudiés (Berge et al., 2013; David et al., 2009; Hamlin et al., 2015; Hermabessiere, 2018; Net et al., 2015; Okeke et al., 2022; Solé et al., 2000), avec des concentrations de l'ordre du pg/L au µg/L (Hermabessiere et al., 2017). Les stabilisateurs UVs, du fait de leur forte utilisation, sont aussi souvent détectés dans l'environnement aquatique (océans, rivières et lacs) (Fent et al., 2010), ainsi que dans les sédiments (Nakata et al., 2009; Zhang et al., 2011).

Des molécules telles que des retardateurs de flamme bromés (PBDEs, HBDEs, TBBPA), des phtalates (DMP, DEP, DiBP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP, DnNP), les stabilisateurs UVs, des nonylphénols ou encore le bisphénol A, ont été identifiées et quantifiées dans les tissus de plusieurs espèces d'organismes marins incluant des organismes consommés par l'Homme (*e.g.* bivalves (Bellas et al., 2014; Cheng et al., 2013; Isobe et al., 2007; Jang et al., 2016; Johansson et al., 2006; Nakata et al., 2012; Ramu et al., 2007), crevettes (Basheer et al., 2004; Verslycke et al., 2005), crabes et calamars (Basheer et al., 2004), et poissons (Cheng et al., 2013; Fent et al., 2010; Ferrara et al., 2008; Peng et al., 2007)) ainsi que divers grands mammifères (*e.g.* baleines, requins, dauphins) (de Boer et al., 1998; Gago-Ferrero et al., 2013). Ces études suggèrent alors une contamination aux additifs plastiques via un transfert de ces molécules à partir de l'eau de mer ou de particules de plastiques ingérées. Ce transfert d'additifs via l'ingestion des MPs serait cependant minoritaire (Jang et al., 2021; Koelmans et al., 2014). En effet, Jang et al. (2021) ont étudié le mécanisme de contamination de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) par le retardateur de flamme HBCD via l'ingestion de MPs ou via la lixiviation de la molécule dans le milieu environnant. Les auteurs ont mentionné qu'une faible quantité d'HBCD est relarguée par les MPs une fois dans le système digestif de la moule et souligne le fait que la bioaccumulation d'HBCD proviendrait majoritairement du lixiviat plutôt que de la désorption de la molécule d'additif post ingestion de MPs.

Il est important de préciser que la présence de certaines molécules dans l'environnement (*e.g.* phtalates, alkylphénols, HAP, RFB, etc.) n'est pas uniquement due au relargage d'additifs par les plastiques. Ces molécules peuvent provenir d'autres sources car elles sont utilisées dans de nombreuses applications, autres que la formulation de plastiques (*i.e.* matériaux électriques, matériaux de constructions, isolants, produits ménagers, textiles, etc.), et déjà présentes dans certains environnements pollués (David et al., 2009; Lee and Kim, 2015). En effet, différentes études se sont intéressées à relier la concentration en plastique dans le milieu marin avec la concentration en additifs dans le milieu ou les organismes marins. Cependant les résultats se confrontent sur ce sujet : par exemple, l'étude de modélisation de Koelmans et al. (2014) a conclu que le transfert d'additifs (nonylphénols et BPA) via l'ingestion de MPs est limité en comparaison aux concentrations de ces additifs déjà présents dans l'eau de mer. Comme mentionné précédemment, Lee and Kim (2015) ont observé une corrélation négative entre les concentrations en PBDEs et les concentrations en MPs, en suggérant une réadsorption des PBDEs présents dans le milieu marin sur la surface des débris. L'étude de Rochman et al. (2014) s'est intéressée à relier la densité de plastique dans l'océan Atlantique sud avec la concentration en PBDEs dans des poissons-lanternes. Sans identifier la provenance des PBDEs (*i.e.* contaminants déjà présents dans l'eau et adsorbés aux plastiques ou additifs plastiques), les résultats ont mis en évidence une corrélation entre la forte présence de plastique avec la concentration et la bioaccumulation de PBDEs dans les poissons. Dans certains cas, la présence de plastique est la source majeure d'additifs dans l'environnement. Al-Odaini et al. (2015) ont montré que la présence de

débris de polystyrène expansé dans l'eau, est la source principale de la présence d'HBCD dans l'eau et dans les moules qui colonisent ces débris. D'autres travaux rejoignent cette conclusion et indiquent que la présence de molécules d'additifs dans l'environnement serait attribuée en majeure partie à la lixiviation des additifs des plastiques (Hirai et al., 2011; León et al., 2019; Zhang et al., 2019). En effet, c'est fortement lié. De nombreuses études ont démontré la capacité des plastiques à relarguer leurs additifs (Andrady, 2011; Oehlmann et al., 2009) et de plus en plus de travaux s'intéressent aux impacts des lixiviats plastiques sur les organismes marins.

La présence de nombreux additifs, dont la toxicité est maintenant avérée, a été observée dans les organismes marins (Groh et al., 2019). Il est dès lors important d'évaluer leur exposition à ces substances ainsi que les impacts qui en découlent. Depuis quelques années, des études d'extractions et de lixiviation des additifs hors de la matrice polymérique ont été réalisées (cf. partie 2.3).

### 2.3. La lixiviation des additifs

Afin de déterminer le risque que représentent les plastiques et leurs additifs sur les organismes marins, leur identité chimique ainsi que leurs niveaux d'exposition doivent être déterminés.

#### 2.3.1. Les paramètres influençant la lixiviation

La lixiviation des additifs est complexe et dépend de plusieurs paramètres : (i) la nature de la matrice polymérique et leurs propriétés physico-chimiques (surface, porosité, cristallinité, espaces entre les monomères), (ii) la nature des additifs plastiques, et (iii) des conditions environnementales (salinité, pH, température de l'eau, irradiation, temps de résidence...) (Kwan and Takada, 2016; Luo et al., 2022).

(i) Concernant l'influence de la matrice polymérique, la lixiviation des composés serait facilitée par une taille de chaîne polymérique courte ainsi que par la présence de volume libre entre les chaînes polymériques, ce qui accélérerait le processus de dégradation et donc de libération des additifs (Andrady, 2017; Hahladakis et al., 2018). La taille de ces volumes libres dépend de l'état physique du polymère, *i.e.* vitreux, caoutchouteux (amorphe) ou cristallin. Un polymère plus caoutchouteux a des volumes libres plus larges qu'un polymère cristallin, qui permettra donc un taux de lixiviation plus faible (Brydson, 1999). Par exemple, dans le cas du PVC (*i.e.* polymère amorphe), les espaces entre les chaînes polymériques sont larges ce qui favorise la migration de composés non liés (*e.g.* APOs) (Godwin and Krauskopf, 2008). L'étude de (Kedzierski et al., 2018) a démontré la libération de composés œstrogéniques dans l'environnement avec un vieillissement et un relargage d'additifs du PVC plus rapide que pour le PET. Par ailleurs, la différence de concentration en additifs selon les

polymères varie (Hahladakis et al., 2018). Par exemple, la concentration en plastifiant dans le PVC est très élevée en comparaison à d'autres polymères, ce qui signifie que de plus grandes quantités de substances non liées peuvent être lessivées (Lithner et al., 2012). Une différence de lixiviation selon les polymères a aussi été observée par d'autres études. Par exemple, León et al. (2019) ont observé un relargage des molécules organophosphorées légèrement supérieur pour les matériaux en PP que pour ceux en PE, pouvant être expliqué par une affinité supérieure de ces composés avec le PE (Mato et al., 2001) ou une dégradation plus rapide du PP (Gewert et al., 2015). A l'inverse, (Heng-Xiang Li et al., 2016) ont observé un plus grand nombre d'analytes ayant lixivié vers l'eau pour le PE en comparaison avec le PP. Ainsi il apparaît difficile de hiérarchiser le risque de lixiviation en fonction de la nature polymérique.

(ii) La nature des polymères n'est pas la seule à influencer la lixiviation des composés. Différentes études ont montré une dynamique de lixiviation différente selon la famille et la nature des additifs. Par exemple, les cinétiques de désorption et de lixiviation sont généralement plus faibles pour les composés très hydrophobes, ceux ayant un coefficient de partage octanol/eau ( $\log K_{ow}$ ) supérieur à 5 (Beiras and Tato, 2019; León et al., 2018). L'étude de Suhrhoff and Scholz-Böttcher (2016) a montré une lixiviation plus importante et plus rapide du BPA en comparaison avec les molécules de phtalates et de citrates, dans de l'eau ultra-pure. En effet, le relargage du BPA de particules de LDPE était initialement très rapide et a atteint un équilibre au bout de 3 jours. Quant aux molécules de phtalates et de citrates, l'équilibre de relargage n'a été atteint qu'au bout de 80 jours.

(iii) Plusieurs paramètres et conditions environnementales peuvent affecter le comportement de lixiviation des additifs : paramètres biotiques (*e.g.* présence de biofilms (Rummel et al., 2017)) et abiotiques (*e.g.* les courants, la salinité, l'irradiation UV, et la température) (Kolomijeca et al., 2020; Luo et al., 2019; Suhrhoff and Scholz-Böttcher, 2016).

Les rayons UV sont généralement considérés comme la principale cause du vieillissement des plastiques (Peipei Sun et al., 2021). Ces processus de vieillissement modifient les propriétés physico-chimiques des particules de plastiques, et des additifs. L'étude de (Yan et al., 2021) a mentionné la complexité de l'influence de ce vieillissement sur le relargage des additifs, après avoir observé que le vieillissement du plastique causé par l'irradiation solaire pourrait soit augmenter la libération de phtalates par modification des propriétés de surface des plastiques, soit la diminuer en réduisant les fractions de phtalates disponibles. Néanmoins, la plupart du temps, la dégradation des plastiques par irradiation UV facilite la lixiviation des additifs vers l'environnement (Luo et al., 2020; Peipei Sun et al., 2021; Yan et al., 2021). Des études expérimentales ont en effet observé



qu'une forte irradiation modifie les propriétés des plastiques (*i.e.* augmentation de la rugosité de surface, de l'hydrophilie, modification des groupes fonctionnels et de la cristallinité, réarrangement des chaînes moléculaires) (Peipei Sun et al., 2021; Yan et al., 2021) et augmente leur fragmentation qui accélère de fait la lixiviation d'additifs (Chunzhao Chen et al., 2019; Qiqing Chen et al., 2019; Khaled et al., 2018; Luo et al., 2019; Paluselli et al., 2019). La température peut aussi avoir un effet significatif sur la lixiviation. Dans l'étude de (Ye et al., 2020), une température plus élevée a accéléré la vitesse de libération du DBP.

Certains paramètres auront un effet inverse et vont inhiber ou ralentir la libération des additifs. Des conditions de haute pression hydrostatiques, retrouvées dans les profondeurs des mers et océans, ralentiraient la libération des additifs organiques les plus lourds (*i.e.* DINP et tris(2-ethylhexyl) phosphate) comme cela a été observé dans l'étude de (Fauvelle et al., 2021). Plusieurs études ont aussi montré qu'une exposition des plastiques à une forte salinité inhibe la libération des additifs (Chunzhao Chen et al., 2019; Peipei Sun et al., 2021). Enfin, les microorganismes peuvent aussi être impliqués dans la dégradation biologique des plastiques, *via* des mécanismes enzymatiques (Yuan et al., 2020). De ce fait, cette dégradation biologique liée aux microorganismes peut affecter la lixiviation de composés. En effet, dans l'étude de Paluselli et al. (2019), l'exposition bactérienne a stimulé la libération de phtalates dans l'eau.

### 2.3.2. Les méthodes employées dans les études de lixiviation

Les études de relargage d'additifs des matrices polymériques se distinguent en deux types d'expérimentations. D'une part, les études dites « d'extractions » où les additifs sont extraits et isolés du matériau plastique à l'aide de conditions artificielles via l'utilisation de solvants organiques. D'autre part, les études de « lixiviation » où les additifs sont isolés par des conditions moins agressives, *via* une exposition souvent à de l'eau de mer ou à de l'eau douce, et plus représentatives de ce qu'il peut se passer dans l'environnement. Les méthodes utilisées au sein des études, concernant les additifs organiques, sont récapitulées dans le Tableau 5.

Le nombre d'études sur le sujet est en continuelle croissance depuis 2015, il a été multiplié par plus de 5 en 5 ans pour atteindre en 2020 environ une cinquantaine d'études sur le sujet (Bridson et al., 2021). Cependant, la plupart de ces études divergent par les approches et les protocoles qu'elles utilisent lors de leurs expérimentations (quantité de plastique (ratio solide/liquide), taille des plastiques incubés, durée, température et niveau d'agitation) (**Tableau 5**).

Les ratios solide/liquide dans la littérature varient de 0,0002 g/L à 250 g/L. La concentration en plastique dans le milieu marin varie fortement selon la localisation sur le globe. Dans la littérature,

la concentration de plastique observée *in situ* dans les océans varie entre  $0,6 \times 10^{-5}$  mg/L (MPs > 330  $\mu\text{m}$  - Mer de Bohai en Chine) (Dubaiash and Liebezeit, 2013) et 8,5 mg/L (MPs > 80  $\mu\text{m}$  - Mer du Nord) (Zhang et al., 2017). Cependant, la majorité des études de lixiviation et de toxicité, utilisent des concentrations de plastique généralement plus importantes que celles retrouvées dans l'environnement (Lenz et al., 2016). Ceci peut s'expliquer par la nécessité d'avoir des concentrations importantes pour visualiser les effets qui seront ensuite à suivre à des niveaux proches de ceux de l'environnement. Toutefois, les expositions à des concentrations réalistes et les effets chroniques (faible dose, long terme) ne sont pas encore assez étudiés à l'heure actuelle (de Sá et al., 2018; Horton et al., 2017). Ce type d'approche permettrait notamment de mieux évaluer l'exposition des organismes aux additifs plastiques au cours de leur vie et donc d'évaluer les risques engendrés. Cependant, des freins méthodologiques subsistent : difficultés de reproduire des écosystèmes complexes en laboratoire et présence de nombreux facteurs confondants en milieu naturel.

Un autre critère de divergence est la taille des particules plastiques incubées. Généralement, la taille des échantillons plastiques utilisés varie de particules inférieures à 30  $\mu\text{m}$  jusqu'à des tailles de 5 mm (Bridson et al., 2021). Les fragments inférieurs à 2 mm sont généralement obtenus par broyage (Qiqing Chen et al., 2019; Jang et al., 2021; Ye et al., 2020). Cependant, toutes les études ne contrôlent pas après broyage l'homogénéité des tailles des particules. De plus, d'un point de vue opérationnel, il est extrêmement compliqué d'obtenir des particules de taille homogène par broyage. Une différence de taille des particules peut avoir une importance sur la lixiviation du fait de la différence de surfaces exposées. En effet, il a été démontré que la lixiviation des additifs est plus importante avec des petites tailles de particules qui possèdent un ratio surface/volume plus élevé et donc une surface d'échange plus importante (Chunzhao Chen et al., 2019; Liu et al., 2020; Sun et al., 2019; Ye et al., 2020).

Des approches globales de lixiviation ont démontré des quantités de relargage d'additifs différentes selon le temps d'incubation des particules de plastique dans un milieu aqueux. Par exemple, plusieurs études ont observé une lixiviation rapide des additifs (Jiang et al., 2019; León et al., 2019; Paluselli et al., 2019; Rani et al., 2017; Suhrhoff and Scholz-Böttcher, 2016) entre 24 et 72 heures. Gardon et al. (2020), ont démontré qu'un temps de lixiviation de 120 heures permet une lixiviation plus complète des additifs en comparaison à un temps de 24 heures. Par contre, un équilibre serait atteint lors d'un temps de lixiviation long, supérieur à 200 heures, voire une diminution de la quantité d'additifs retrouvés dans l'eau qui serait due à une réadsorption des composés lixiviés à la surface des particules de plastiques (Karapanagioti and Klontza, 2008; Romera-Castillo et al., 2018). Rappelons que ces études ont été effectuées en laboratoire. Dans le milieu marin, une tout autre cinétique pourrait être observée en tenant compte des facteurs biotiques et abiotiques précédemment mentionnés ainsi que du caractère ouvert du milieu doté d'une capacité de dilution infinie (Bridson et al., 2021).

Quelques études de terrain ont pris en compte des temps de lixiviation plus longs. Par exemple, une première étude a montré un relargage complet, à hauteur de 99 et 99,5%, de deux antioxydants (respectivement le 2,4- Di-tert-butyle phénol et le BHT) au bout de 500 jours (Boonnorat et al., 2021). L'étude de (Kedzierski et al., 2018) a, quant à elle, permis d'observer un relargage d'une grande quantité d'additifs pendant le premier mois de présence de PVC dans le milieu marin, puis une lente diminution après environ deux mois. En prenant en compte l'altération des couches de surfaces des MPs au fil de leur séjour dans l'environnement, les additifs présents dans les couches plus profondes du matériau finiraient par devenir disponibles et être libérés. Par conséquent, un phénomène de lixiviation illimité serait potentiellement observé jusqu'au relargage total des additifs au bout d'un certain temps. Pour être au plus près de conditions environnementales plus réalistes, d'autres études ont utilisé des approches dynamiques ou semi-dynamiques. Différentes approches ont été utilisées : l'ajout en continu de nouveau milieu (pour éviter l'équilibre des concentrations) (Bandow et al., 2017; Fikarová et al., 2019), ou l'utilisation d'une phase solide provoquant une adsorption continue en agissant comme un capteur ayant une grande capacité d'adsorption des additifs organiques relargués des plastiques (Henkel et al., 2019; Sun et al., 2019; Ye et al., 2020).

Pour finir, d'autres paramètres tels que la température d'incubation et l'intensité de l'agitation varient fortement entre les études. Concernant les températures d'incubation, la majorité des études se placent à une température « ambiante », *i.e.* entre 20 et 25 °C (17 études sur un total de 24 études donnent l'information, parmi les études compilées Tableau 5). Un nombre plus faible d'études se placent à des températures supérieures 25 °C, *i.e.* entre 28 et 50 °C (8 études sur 24) ou à des températures basses, *i.e.* < 10 °C (2 études sur 24). Le choix de l'agitation des solutions varie aussi fortement. Parmi les données compilées dans le Tableau 5, sur 18 études ayant donné l'information, la majorité se place entre 60 et 90 rotations par minute (rpm) ou entre 125 et 250 rpm (5 études pour chacune des tranches), quelques autres études emploient des rpm > 350 (3/18), < 21 rpm (3/18) ou encore se placent dans des conditions statiques (2/18).

L'absence de méthode harmonisée peut rendre l'interprétation des résultats problématique et empêche les comparaisons des résultats de lixiviations. Cependant, les différences dans le choix de certains paramètres expérimentaux (*e.g.* temps de lixiviation, températures, exposition à la lumière ou obscurité, vieillissement accéléré des échantillons...) permettent de se rapprocher des conditions environnementales afin d'intégrer les divergences des processus de lixiviation dans l'environnement marin, de prendre en compte les variations des paramètres environnementaux tels que les variations de températures, l'accélération de la dégradation des matériaux plastiques par l'exposition aux UVs, ou encore d'estimer les cinétiques de relargage des additifs lors de leur séjour dans l'environnement.

### 2.3.3. Cas de la lixiviation des additifs à partir de produits biosourcés

La plupart des publications se sont concentrées sur l'étude des thermoplastiques, notamment le PE, PP, PVC et PS, qui font partie des plastiques les plus retrouvés dans l'environnement et les plus produits (Andrady, 2017). En revanche, la part des plastiques biosourcés (PLA, PBHA, PBHB), dont l'utilisation prend de l'ampleur, est encore peu représentée dans les études. Actuellement, nous avons connaissance de six recherches qui ont fait état d'études sur la lixiviation d'additifs plastiques de ces matériaux alternatifs : Bejgarn et al. (2015; Klein et al. (2021; Zimmermann et al. (2021; Zimmermann et al. (2019; Zimmermann et al. (2020a; Zimmermann et al. (2020b). Ces études ont mis en avant la lixiviation de molécules chimiques de ces matériaux vers un milieu aqueux et/ou un solvant (*e.g.* méthanol). En milieu aqueux, Zimmermann et al. (2021) ont mis en évidence, *via* une analyse non ciblée, la lixiviation de 1 000 composés chimiques provenant de matériaux en PLA vers de l'eau ultra-pure après une lixiviation de 10 jours. Leurs résultats ont montré une toxicité avérée sur divers modèles biologiques. Dans cette étude, le nombre de composés chimiques lixiviés à partir du PLA était inférieur aux autres polymères (*i.e.* PS, PET, PE). Par contre, Klein et al. (2021) ont observé des résultats contraires, dans leurs études de lixiviation vers de l'eau ultra-pure, pendant 24 heures : les matériaux en PLA ont libéré un plus grand nombre de composés chimiques que les polymères pétrosourcés. Pour finir, deux autres publications ont étudié la lixiviation d'additifs dans l'eau de mer : avec du PLA pendant 24 heures pour Zimmermann et al. (2020a) ; avec du bio-PET pendant 72 heures pour Bejgarn et al. (2015). Ces études ont toutes les deux mentionné le relargage de composés chimiques, ayant montré une toxicité via différents bioessais, sans pouvoir déterminer leur structures chimiques et identités.

### 2.3.4. Cas de la lixiviation des additifs à partir des matériaux destinés à être en contact avec les denrées alimentaires (MCDA)

Des composés toxiques ont aussi été identifiés dans les MCDA. Dans leur review sur l'évaluation du risque des MCDA, Muncke et al. (2017) parlent même de « FCCs » signifiant « Food Contact Chemicals », désignant les molécules chimiques utilisées et incluses dans les MCDA, *i.e.* les additifs, les aides à la transformation, les monomères. Par exemple, des études ont détecté la présence d'antioxydants, de stabilisateurs UVs et de plastifiants tels que les phtalates dans des MCDA (Lahimer et al., 2017; Bo Li et al., 2015). Dans une démarche d'évaluation des risques pour l'exposition de l'Homme ou des organismes à ces additifs présents dans les MCDA, plusieurs études ont investigué la capacité des additifs à migrer dans les produits de consommation. En effet, de nombreuses substances chimiques incluant des additifs plastiques ont la capacité de migrer à partir des MCDA (Zimmermann et al., 2021; Zimmermann et al., 2020a), entre autres : des alkylphénols, des phtalates, des adipates,

l'ATBC, le BHT, le BPA ont déjà été identifiés lors d'analyse de lixiviation et migration (Fasano et al., 2012; Galmán Graíño et al., 2018; Hamlin et al., 2015; Isobe et al., 2007; Qian et al., 2018).

Dans le cadre des études portant sur les MCDA, la plupart des tests de migrations sont effectués selon les protocoles mis en place via des directives européennes comme la directive du Conseil 82/711/EEC ou 85/572/EEC et la réglementation (EU) No 10/2011 (*e.g.* utilisation de solvants, de simulants alimentaires, de fortes températures) (European Commission, 2011a; FDA, 2007; Groh and Muncke, 2017). Ces normes impliquent d'effectuer les tests de migration sous certaines conditions (*i.e.* pendant 10 jours à 40 °C ou 60 °C) en utilisant différents simulants alimentaires (*e.g.* huiles, eau, acide acétique à 3%, isooctane, éthanol à 10%, 20%, 50% ou 95%, etc.) ce qui équivaldrait, dans le cas des bouteilles en plastique par exemple, à mimer les conditions d'un stockage de 1 an à une température de 23 °C (Gehring and Welle, 2018; Schmid and Welle, 2020). Cependant, Schmid and Welle (2020) mentionnent le fait que des études dans des conditions plus réalistes sont nécessaires. Leur étude souligne le fait que ces tests de migration selon les normes des directives européennes (*i.e.* utilisant des conditions bien particulières évoquées plus haut) sont appliqués pour tous types de produits MCDA indépendamment de leur usage, ce qui n'est pas toujours pertinent. Par exemple, une étude de migration en suivant les recommandations normées dans des simulants alimentaires (*i.e.* migration pendant 60 jours à 40 °C dans de l'éthanol à 20%) engendre un fort relargage du 2-aminobenzamide à partir de bouteilles en PET. Alors que dans des conditions plus réalistes (*i.e.* migration pendant 60 jours à 40 °C dans l'eau minérale de la bouteille), la migration spécifique du 2-aminobenzamide était conforme à la limite de migration légale (Gehring and Welle, 2017). Plusieurs études de migration avec et sans simulants alimentaires ont été publiées par ces mêmes auteurs, *i.e.* Gehring et al., (2017; 2018). Les auteurs ont montré qu'une migration selon les recommandations européennes surestime grandement la migration par rapport aux conditions réalistes de stockage (fixées à 1 an et 23 °C) et serait représentative d'un stockage allant jusqu'à 11,7 ans. Cependant, cette surestimation donne un facteur de sécurité supplémentaire dans le cadre d'une évaluation de risques sanitaires. Par ailleurs, les études de migrations ne prennent pas en compte l'effet cocktail de la multitude de molécules présentes et ajoutées dans les matériaux plastiques, ce qui est une chose complexe à réaliser mais néanmoins importante dans l'évaluation des risques.

Concernant ces MCDA, peu d'études de lixiviations *stricto sensu* ont été menées dans le cadre d'une pollution environnementale par ces matériaux. Pour autant, certains MCDA, tels que les bouteilles, les plastiques à usage unique et les barquettes alimentaires font partie des déchets les plus retrouvés sur les plages et dans les océans (de Kock et al., 2020; Gerigny et al., 2018; OSPAR, 2018). On pourra citer Hamlin et al. (2015) ayant démontré la lixiviation de nonylphénols à partir de PE dans de l'eau de mer au bout de 48 heures ; et Zimmermann et al., (2021; 2020a; 2020b) ayant investigué la

lixiviation de différents types de MCDA pétrosourcés et biosourcés dans divers milieux et réalisé différents tests de toxicité *in vitro*.

Pour conclure sur la lixiviation des additifs, l'ensemble des études citées tout au long de cette partie a pu montrer la capacité des additifs à diffuser du plastique de consommation vers les milieux environnants. Certaines d'entre elles ont aussi mis en évidence la toxicité de ces lixiviats plastiques sur divers organismes.

Tableau 5 : Méthodes et paramètres utilisés pour la préparation de lixiviats dans les études écotoxicités.

Polymère	Taille échantillons	[lixiviat]	Milieu	Durée lixiviation	Exposition lumière	T° (° C)	Agitation (rpm)	Filtration	Analyse chimique et additifs ciblés	Organismes exposés	Réf.
PP, PS, PE, PVC, PET, PLA, Nylon, bio-PET	0,3-1 mm	100 g/L	EDM naturelle	24h - 92h	Non	-	6 - 21	45 µm	SPE - UPLC-HRMS (pas d'identification)	Copépode ( <i>Nitocra Spinipes</i> )	[1]*
PET, PS, PP, PVC, pneu	-	80 g/L	Milieu de culture ; EDM filtrée	14 jours	non	25	125	0,2 µm	GC-MS (phtalates, bisphénol A, acetophénone)	Moule ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) ; Algues ( <i>Skeletonema costatum</i> et <i>Raphidocelis subcapitata</i> )	[2]*
PSE	Fragments : <1-10 cm <sup>3</sup> Sphères : 2-10 mm	Fragments : 2 g/L Sphères : 20-60 sphères/L	Milieu de culture	28 jours	16h/8h lum/obs	20	80	0,45 µm	HPLC-MS (HBCD, bisphénol A, UV-326)	Algues ( <i>D. salina</i> , <i>S. rubescens</i> , <i>C.saccharophila</i> et <i>S. bacillaris</i> )	[3]*
PP	-	0 à 200 mL de pellet/L	EDM	72h	-	-	-	-	-	Moule ( <i>Perna perna</i> )	[4]*
PP, PE	<5 mm	0,1-100 g/L	EDM	24h - 120h	Lumière artificielle	28	600	1,3 µm	SBSE-TD-GC/MS (APOs)	Huître perlière ( <i>Pinctada margaritifera</i> )	[5]*
PE (sacs)	-	1 sac/350 mL	EDM artificielle	48 h	non	23	-	-	LC-MS/MS (APOs)	Dottyback orchidée ( <i>Pseudochromis fridmani</i> )	[6]*
PSE	5 mm	1 g/L	EDM filtrée	4 - 10 jours	-	-	-	-	SE-HPLC-MS (HBCD)	Moule ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	[7]*
Pneu	3 mm <sup>2</sup>	10 g/L	ED	10 jours	UV-A	4 - 34	0 - 200	1 mm	SERS-GC-MS	Poisson Tête de boule ( <i>Pimephales promelas</i> )	[8]*
PE	1 cm <sup>2</sup>	10 g/L	EDM filtrée	48h	obscurité	25	90	-	-	Palourde ( <i>Meretrix meretrix</i> )	[9]*
PP, PET, PS, PE, PVC, bio-PBS, PBAT, PLA	<5 mm	50 g/L	Eau ultra-pure	24h	UV-A et UV-B	33,4	-	-	SPE-HPLC-MS/MS (Pas d'identification)	Bioessais <i>In vitro</i>	[10]*
PET, PVC, PE, PP, PS, PC	1 cm <sup>2</sup>	0,04-0,5 m <sup>2</sup> /L	EDM filtrée	24h	-	28	-	0,2 µm	HPLC-MS (APOs)	Bernacle ( <i>Amphibalanus amphitrite</i> )	[11]*
PE, PS, PC, PVC, PA, PMMA, PAT, PU	-	25 g/L	Eau ultra-pure	15 jours	-	25	160	-	UHPLC-MS/MS (BPA)	Aucun	[12]
PC, PVC, PU, PE, PS, PET, PMMA, PTFE, ABS, PP	-	65-174 g/L	Eau déionisée	24h-3 jours	16h/8h lum/obs	20	60	-	GC-MS (Phtalates)	Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	[13]*
PP, HDPE, PVC, ABS, epoxy	2 cm <sup>2</sup>	250 g/L	Eau déionisée	3 jours	obscurité	20-50	90	-	GC-M (Phtalates)	Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	[14]*
PUF	3 mm	0,7 g/200 mL	Eau déionisée, du robinet et EDM	48h	-	25	250	0,45 µm	FTIR et RAMAN (Pas d'identification)	Algue ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	[15]*

Tableau 5 (Suite - 2/3)

Polymère	Taille échantillons	[lixiviat]	Milieu	Durée lixiviation	Exposition lumière	T° (° C)	Agitation (rpm)	Filtration	Analyse chimique et additifs ciblés	Organismes exposés	Réf.
PE	-	250 mL/L	EDM filtrée	24h	-	-	0	-	-	Oursin ( <i>Lytechinus variegatus</i> )	[16]*
PVC	<250 µm	100 g/L	EDM artificielle	24h	non	20	1	1,2 µm	ICP-MS (API)	Oursin ( <i>Paracentrotus lividus</i> )	[17]*
PE, PVC	PE : 2 cm <sup>2</sup> x 10 µm PVC : 1 cm x 9 mm x 5mm	PE : 0,8 g/L PVC : 2,5 g/L	EDM filtrée	3 mois	Lum/obsc	22	-	-	GC-MS (Phthalates)	Aucun	[18]
PSE	< 1mm	<i>In vivo</i> : 0,18 g/L <i>In vitro</i> : 2 g/L	<i>In vivo</i> : EDM <i>In vitro</i> : Eau déionisée	<i>In vivo</i> : 0 - 6 mois <i>In vitro</i> : 0 - 14 jours	non	7,1-28,6	-	-	SE-LC-MS/MS (HBCD)	Aucun	[19]
PET, PE, PP, PS	<350 µm	250 g/L	EDM artificielle	96h	UV + lumière	20-30	-	40 µm	LC-HRMS (Pas d'identification)	Lignées cellulaires de rats et cochons d'Inde	[20]*
PE, PP, PS oxo-biodégradables	1,6 mm	100 g/L 10 : 1 (L/S)	Eau Milli-Q	24h	obscurité	20	1	11 µm	ICP-MS et GC/MS (Pas d'identification)	Daphnie ( <i>D.magna</i> ) ; Plantes <i>S.saccharatum</i> , <i>L.sativum</i> , <i>S.alba</i> et <i>V.faba</i> ; Bactérie ( <i>V.fischeri</i> )	[21]*
PVC	< 60 µm	100 g/L	Milieu de culture	21 jours	16h/8h lum/obsc	20	-	-	GC-FID (Phthalates)	Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	[22]*
PP	3.3-4.7 mm	20 mL de pellets/L	EDM	24h	-	-	-	-	-	Escargot ( <i>Littorina littorea</i> )	[23]*
PE PS, PET, PVC	5 mm <sup>2</sup>	10 g/L	Eau déionisée et EDM artificielle	1 à 78 jours	UV	T° amb	150	-	SE-GC-FID-MS (BPA ; phtalates)	Aucun	[24]
Pneu	2.3 mm; aire=2,1 mm <sup>2</sup>	100 g/L	EDM filtrée	14j	Obscurité	T° amb	350	1,2 µm	GC-MS/MS et ICP-MS (APOs et API)	Huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	[25]*
Pneu	-	0 à 100 mg/L	EDM filtrée	14j	Obscurité	20	240	1,2 µm	GC-MS/MS et ICP-OES (APOs et API)	Huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	[26]*
HDPE/PVC	1-2 cm <sup>2</sup>	1,6 à 25 g/L (HDPE); 0,125 à 5 g/L (PVC)	Milieu de culture	5 jours	oui	22	-	0,2 µm	HPLC-MS/MS (APOs)	Bactérie ( <i>Prochlorococcus spp</i> )	[27]*
PE, PP	3,3-4,7 mm	12 g/L	EDM	24h	-	-	-	-	-	Moule ( <i>Mytilus edulis</i> )	[28]*
PP, PUR, PLA, kaolin	<59 µm	PVC : 0,045 g/L PUR : 0,236 g/L PLA : 0,122 g/L	Milieu de culture	48h	-	-	80	1 µm	-	Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	[29]*



Tableau 5 (Suite - 3/3)

Polymère	Taille échantillons	[lixiviat]	Milieu	Durée lixiviation	Exposition lumière	T° (° C)	Agitation (rpm)	Filtration	Analyse chimique et additifs ciblés	Organismes exposés	Réf.
PE, PS, PP, PET, PVC, PUR, PLA	0,5-2 cm	40-41 g/L	Eau ultra-pure	10 jours	Obscurité	40	-	-	SPE-UPLC-QTOF-MS/MS (Pas d'identification)	Bioessais <i>In vitro</i>	[30]*
PVC	350-650 µm	5 g/L	-	24h à 28 j	-	25	150	-	SE-GC-MS (Dibutyl phtalate)	Aucun	[31]

Références : [1] : (Bejgarn et al., 2015) ; [2] : (Capolupo et al., 2020) ; [3] : (Chae et al., 2020) ; [4] : (e Silva et al., 2016) ; [5] : (Gardon et al., 2020) ; [6] : (Hamlin et al., 2015) ; [7] : (Jang et al., 2021) ; [8] : (Kolomijeca et al., 2020) ; [9] : (Ke et al., 2019) ; [10] : (Klein et al., 2021) ; [11] : (Heng-Xiang Li et al., 2016) ; [12] : (Liu et al., 2019) ; [13] : (Lithner et al., 2009) ; [14] : (Lithner et al., 2012) ; [15] : (Luo et al., 2019) ; [16] : (Nobre et al., 2015) ; [17] : (Oliviero et al., 2019) ; [18] : (Paluselli et al., 2019) ; [19] : (Rani et al., 2017) ; [20] : (Rummel et al., 2019) ; [21] : (Schiavo et al., 2020) ; [22] : (Schrack et al., 2019) ; [23] : (Seuront, 2018) ; [24] : (Suhroff and Scholz-Böttcher, 2016) ; [25] : (K. Tallec et al., 2022) ; [26] : (Kevin Tallec et al., 2022) ; [27] : (Tetu et al., 2019) ; [28] : (Uguen et al., 2022) ; [29] : (Zimmermann et al., 2020b) ; [30] : (Zimmermann et al., 2021) ; [31] : (Yan et al., 2021)

\* : réfère au **Tableau 6** pour des informations concernant les tests de toxicité.

ABS : acrylonitrile-butadiène-styrène ; APOs : additifs plastiques organiques ; API : additifs plastiques inorganiques ; EDM : eau de mer ; GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse ; GC-FID : GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme HBCD : Hexabromocyclododécane ; HPLC : chromatographie en phase liquide haute performance ; HR : haute résolution ; ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif ; ICP-OES : spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif ; L/S : ratio liquide solide ; lum/obs : lumière/obscurité ; MS/MS : spectrométrie de masse en tandem ; QTOF-MS : spectrométrie de masse quadripôle-temps de vol ; PET : Polyéthylène téréphtalate ; PS : polystyrène ; PP : polypropylène ; PVC : polyvinyl chloride ; PE : polyéthylène ; PU : polyuréthane ; PSE : polystyrène expansé ; PLA : acide polylactique ; PTFE : Polytétrafluoroéthylène ; PMMA : polyméthyl méthacrylate ; SBSE : extraction par sorption sur barreau magnétique ; SE : extraction au solvant ; SERS : Spectroscopie Raman améliorée en surface ; SPE : extraction en phase solide ; UPLC : chromatographie en phase liquide ultra performance .

## 2.4. La toxicité des additifs plastiques sur les organismes marins

La toxicité des plastiques et MPs a beaucoup été étudiée. Cependant en comparaison avec les études de toxicité liées à l'ingestion de particules de MPs, encore peu d'études ont été réalisées sur la toxicité chimique de ces particules.

En effet, la toxicité observée suite à une exposition à des MPs pourrait être majoritairement due aux additifs plutôt qu'aux particules de plastiques elles-mêmes (Barrick et al., 2021; e Silva et al., 2016; Zimmermann et al., 2020b). Cette hypothèse est aussi confirmée par Schrank et al. (2019) qui ont observé une toxicité sur la morphologie et le nombre de descendants de *Daphnia magna* suite à l'ingestion de MPs contenant du DINP, contrairement aux MPs vierges en additifs. Jang et al. (2021), quant à eux, ont mentionné que la bioaccumulation de l'HBCD proviendrait majoritairement de l'exposition au lixiviat plutôt que de l'ingestion de MPs, en conditions de laboratoire. De ce fait, l'étude ciblée de l'impact des additifs plastiques, via l'exposition des organismes à des lixiviats de plastiques, s'avère être pertinente.

Des reviews sur le sujet ont été publiées et recensent des effets toxiques observés dans différentes études suite à l'exposition de divers organismes à des lixiviats de plastiques contenant des additifs relargués des matériaux (Gunaalan et al., 2020; Huang et al., 2021). Dans la littérature, ces effets sont multiples (**Tableau 6**) : altération de la croissance algale et du processus photosynthétique (Capolupo et al., 2020; Tetu et al., 2019), diminution de la survie et de la probabilité de fixation pour la larve de bernacle (Heng-Xiang Li et al., 2016), mortalité, modifications comportementales et embryonnaires chez le poisson et les bivalves (Balbi et al., 2016; Boyle et al., 2020; Capolupo et al., 2020; e Silva et al., 2016; Hamlin et al., 2015; Jang et al., 2021; K. Tallec et al., 2022), mortalité chez plusieurs espèces de copépodes (Bejgarn et al., 2015; Lithner et al., 2009; Lithner et al., 2011) et chez *Daphnia magna* (Zimmermann et al., 2020b). Dans cette dernière étude, les auteurs ont comparé la toxicité de lixiviats de PVC dans de l'eau ultra-pure avec la toxicité d'extraits méthanol (MeOH) des mêmes particules de PVC. Seuls les extraits MeOH ont engendré une toxicité, suggérant que dans des conditions plus réalistes la toxicité des additifs lixiviés de ce matériau serait limitée.

Dans la majorité des études d'impacts des lixiviats plastiques, la toxicité rapportée n'a pas été attribuée à un ou des additifs spécifiques en particulier mais au lixiviat entier. Dans certains cas, le relargage de composés chimiques toxiques de ces matériaux est mentionné, sans pouvoir déterminer leurs structures chimiques et leur identités (Bejgarn et al., 2015; Zimmermann et al., 2020a). Souvent, des informations sur la composition du lixiviat sont absentes ou incomplètes. Une identification chimique est cependant importante pour identifier les composés d'additifs présents dans le lixiviat qui seraient potentiellement à l'origine des effets observés. Pour les études étant parvenues à identifier certains composés d'additifs dans les lixiviats, (Gardon et al., 2020; Hamlin et al., 2015; Schrank et al., 2019; K. Tallec et al., 2022), il leur était compliqué d'attribuer la toxicité observée à une molécule en

particulier. En effet, outre les substances connues, les plastiques contiennent un grand nombre de composés du type NIAS, donc non ciblés puisque non identifiés, qui peuvent être responsables des toxicités observées. Tian et al. (2021) ont par exemple démontré, après des années d'investigation, le rôle majeur d'un produit de transformation quinonique hautement toxique, provenant de la dégradation d'un antioxydant communément utilisé dans les pneus (6PPD, *i.e.* N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine) dans les mortalités récurrentes observées chez les populations de saumon Coho dans les eaux côtières américaines (Urban Runoff Mortality Syndrome ; URMS). Pour une grande variété de molécules, aucune méthode analytique n'a été développée ou n'est assez sensible pour les détecter et les quantifier. De ce fait, il est primordial de développer des méthodes analytiques robustes qui permettent une analyse exhaustive et sans a priori des compositions chimiques des débris plastiques.

**Tableau 6 : Etudes sur la toxicité et écotoxicité de lixiviats de polymères plastiques sur les organismes marins et aquatiques**

Organismes tests	Effets observés	Réf.
<b>Plantes et microorganismes</b>		
Algues ( <i>S.costatum</i> et <i>R. subcapitata</i> )	Croissance, mortalité	[2]
Algues ( <i>D. salina</i> , <i>S. rubescens</i> , <i>C.saccharophila</i> et <i>S. bacillaris</i> )	Activité photosynthétique	[3]
Algue ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Croissance et photosynthèse	[15]
Bactérie ( <i>Prochlorococcus</i> spp)	Croissance	[27]
Plantes ( <i>S.saccharatum</i> , <i>L.sativum</i> , <i>S.alba</i> et <i>V.faba</i> )	Croissance	[21]
<b>Invertébrés</b>		
Copépode ( <i>Nitocra spinipes</i> )	Mortalité	[1]
Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	Mortalité	[13]
Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	Mortalité	[14]
Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	Mortalité ; reproduction	[21]
Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	Longueur du corps ; reproduction	[22]
Daphnie ( <i>Daphnia magna</i> )	Mortalité	[29]
Palourde ( <i>Meretrix meretrix</i> )	Mortalité ; développement embryo-larvaire	[9]
Moule ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Stabilité membranes des lysosomes, fertilisation gamètes, développement embryo-larvaire	[2]
Moule ( <i>Perna perna</i> )	Développement embryo-larvaire	[4]
Moule ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Bioaccumulation du hexabromocyclododécane	[7]
Moule ( <i>Mytilus edulis</i> )	Comportement chimiotactique et chimio cinétique	[28]
Huître perlière ( <i>Pinctada margaritifera</i> )	Développement embryo-larvaire	[5]
Huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Développement embryo-larvaire	[25]
Huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Filtration et respiration des juvéniles	[26]
Bernacle <i>Amphibalanus amphitrite</i>	Mortalité et colonisation du milieu	[11]
Sea urchin ( <i>Lytechinus variegatus</i> )	Développement embryo-larvaire	[16]
Oursin ( <i>Paracentrotus lividus</i> )	Développement embryo-larvaire	[17]
Escargot ( <i>Littorina littorea</i> )	Comportement envers les prédateurs	[23]
<b>Poissons</b>		
Fathead Minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Succès et durée d'éclosion</li> <li>• Longueur du corps</li> <li>• Malformations</li> </ul>	[8]
Dottyback orchidée ( <i>Pseudochromis fridmani</i> )	Mortalité	[6]
<b>Bioessais</b>		
Lignées cellulaires (rats et cochons d'Inde)	Cytotoxicité, activité métaboliques, activités endocriniennes, stress oxydant	[20]
Microtox®	Inhibition bioluminescence (mortalité)	[21]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microtox®</li> <li>• Lignée cellulaire AREc32</li> <li>• Test YES sur la protéine GFP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition bioluminescence (mortalité)</li> <li>• Stress oxydant :</li> <li>• Activité endocrinienne</li> </ul>	[10] ; [30]
<p>Références : [1] : (Bejgarn et al., 2015) ; [2] : (Capolupo et al., 2020) ; [3] : (Chae et al., 2020) ; [4] : (e Silva et al., 2016) ; [5] : (Gardon et al., 2020) ; [6] : (Hamlin et al., 2015) ; [7] : (Jang et al., 2021) ; [8] : (Kolomijeca et al., 2020) ; [9] : (Ke et al., 2019) ; [10] : (Klein et al., 2021) ; [11] : (Heng-Xiang Li et al., 2016) ; [13] : (Lithner et al., 2009) ; [14] : (Lithner et al., 2012) ; [15] : (Luo et al., 2019) ; [16] : (Nobre et al., 2015) ; [17] : (Oliviero et al., 2019) ; [20] : (Rummel et al., 2019) ; [21] : (Schiavo et al., 2020) ; [22] : (Schrank et al., 2019) ; [23] : (Seuront, 2018) ; [25] : (K. Tallec et al., 2022) ; [26] : (Tetu et al., 2019) ; [27] : (Uguen et al., 2022) ; [28] : (Zimmermann et al., 2020b) ; [29] : (Zimmermann et al., 2021)</p> <p>YES : Yeast estrogens screen ; GFP : green fluorescent protein</p>		

### 3. L'exposition de l'Homme aux MPs et additifs *via* la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture, et impacts sur la santé

Parmi les études ayant démontré la présence de MPs et d'additifs dans les organismes marins, un grand nombre de poissons et fruits de mers sont consommés par l'Homme (EFSA, 2016; Smith et al., 2018). De ce fait, il est important de tenter d'évaluer l'exposition de l'Homme à ces micropolluants *via* la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture. Une telle évaluation du risque pour la santé humaine prend en compte à la fois l'exposition (ration alimentaire et niveau de contamination) et le danger (toxicité associée aux contaminants identifiés).

#### 3.1. La production et la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture

Depuis les 20 dernières années, la production mondiale de produits de la pêche et de l'aquaculture pour la consommation humaine a fortement augmenté dans le monde. Elle était de 71.1 millions de tonnes dans les années 90, et est estimée à 157 millions de tonnes en 2020 (FAO, 2022). (**Figure 5**). Parmi cette quantité, l'aquaculture représente un peu plus de la moitié (56%) de la production (FAO, 2022). Concernant la répartition de production selon les espèces pour l'aquaculture (marine et côtière), la production est majoritaire pour les poissons (47%), suivie des mollusques (14,5%), des crustacés (9%), et des autres animaux aquatiques (1%) (le restant concerne les algues à hauteur de 29%). Concernant la pêche de capture, la production de poisson est largement majoritaire (85%), suivie des mollusques et crustacés (7% chacun) puis des autres animaux aquatiques (1%) (FAO, 2022). Tous les pays sont concernés par cette augmentation de la production de produits de la pêche à l'exception de l'Europe dont la production stagne depuis les années 1990, et de l'Amérique, dont la production a diminué depuis 2010. Dans le monde, les pays asiatiques sont les leaders de la production de poissons en représentant 70% de la production globale (la Chine représentant à elle seule 35%). Ils sont suivis par les pays d'Amérique du Nord (14%), l'Europe (10%), l'Afrique (7%) et enfin l'Océanie (1%) (FAO, 2022).

Tout comme la production, la consommation mondiale de produits de la mer augmente continuellement (**Figure 5**). Chaque année, depuis 1961, elle augmente en moyenne de 3% par an (FAO, 2022). En 2020, la consommation mondiale de produits de la mer équivaldrait en moyenne à 20,2 kg/an/personne, contre 9,9 kg dans les années 1960. Ces quantités ne sont cependant pas identiques d'un pays à l'autre. Concernant les poissons, la quantité consommée par personne varie de moins de 1 kg/an (en Afghanistan), à plus de 80 kg/an (en Islande) (selon des critères culturels, économiques, géographiques, climatiques) (**Figure 6**). Malgré ces différences, une tendance apparaît pour les pays développés et en voie de développement avec, respectivement, une consommation moyenne de 26,5 kg et 5,4 kg/personne/an en 2019 (FAO, 2022).

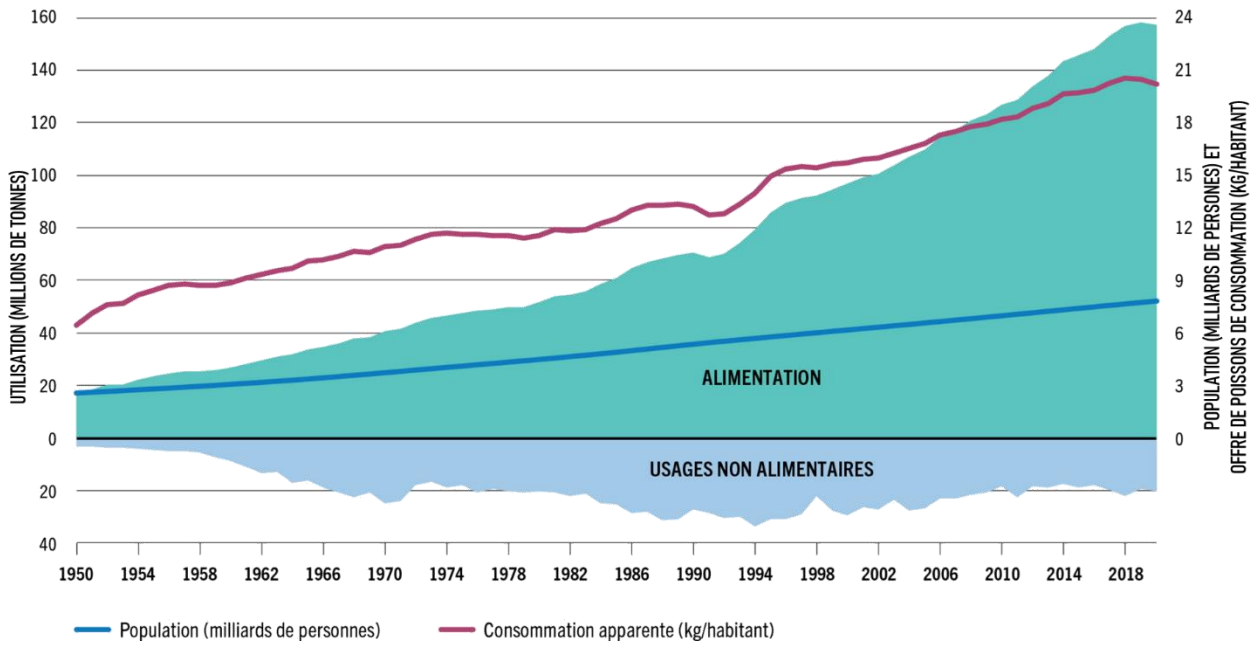


Figure 5 : Evolution de la production, de l'utilisation et de la consommation mondiale halieutique et aquacole de 1950 à 2020 (en millions de tonnes). D'après FAO., 2022.

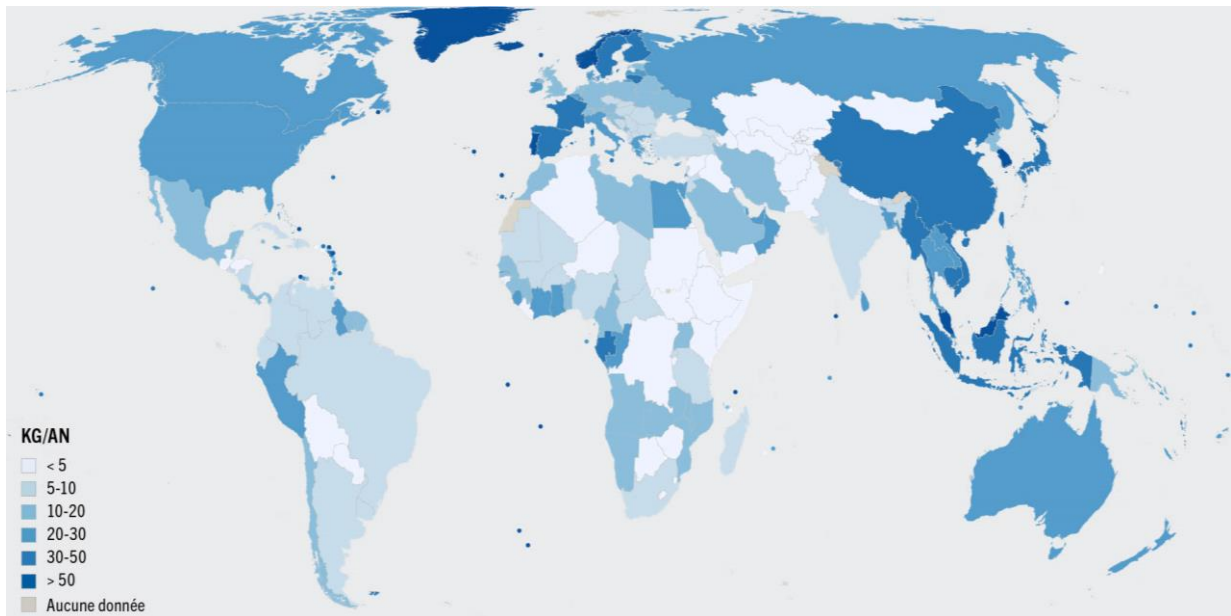
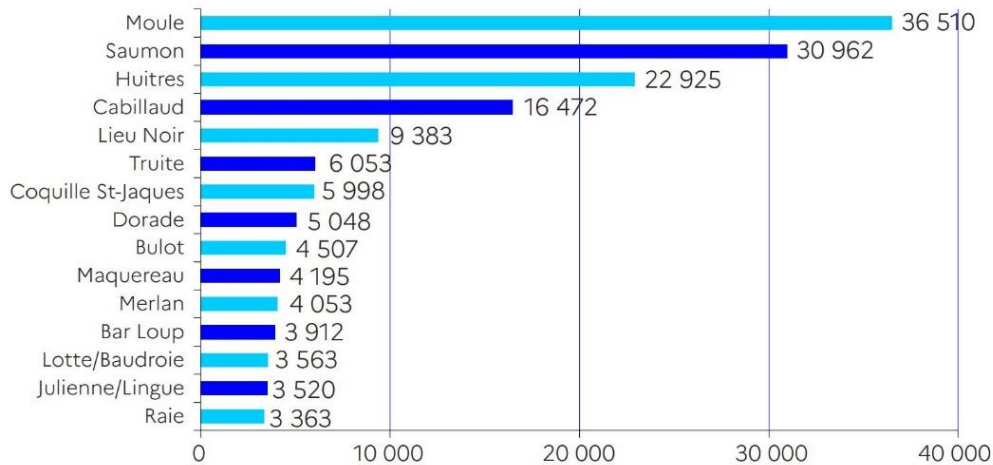


Figure 6 : Estimation de la consommation moyenne de poisson par personne et par an (moyenne entre 2015 et 2019). D'après FAO., 2022.

En France, l'espace maritime (10,7 millions de km<sup>2</sup>) représente le deuxième espace maritime mondial derrière les Etats-Unis. En 2019, la France se place à la 4<sup>ème</sup> place parmi les producteurs Européens avec 755 000 tonnes de produits pêchés (FranceAgriMer, 2022). Au niveau de la consommation, les français sont les 4<sup>èmes</sup> plus gros consommateurs de produits de la pêche en Europe, avec une moyenne de 33,3 kg/personne/an depuis 2013 (Lusher et al., 2017). A l'échelle nationale, les 3 produits de la pêche les plus achetés et consommés en 2020 étaient les moules (36 510 t), le saumon (30 962 t) et les huîtres (22 925 t) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Produits de la pêche et de l'aquaculture les plus achetés par les Français en 2020. D'après FranceAgriMer., 2022.**

### 3.2. L'exposition aux MPs via la consommation de produits de la mer

Un rapport récent de l'organisation mondiale de la santé accompagné de plusieurs études a souligné l'omniprésence des MPs dans l'environnement et dans les denrées alimentaire et l'eau de consommation. Ils ont suscité de grandes inquiétudes quant à l'exposition et aux effets des nano- et microplastiques sur la santé humaine (Sharma and Chatterjee, 2017; WHO and Organization, 2019).

En effet, malgré une absence d'harmonisation des études de quantification et de caractérisation des MPs (Hermabessiere, 2018), rendant difficile la comparaison des données, la présence de MPs a été démontrée dans divers produits alimentaires (Cox et al., 2019). Parmi eux figurent l'eau (WHO and Organization, 2019), la viande emballée (Kedzierski et al., 2020), la bière (Liebezeit and Liebezeit, 2014), le sucre et le miel (Liebezeit and Liebezeit, 2013) et le sel de table (Iñiguez et al., 2017; Karami et al., 2017; Lee et al., 2019; Renzi Monia et al., 2019; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2020). Mis à part ces produits, la majorité des études se focalisent sur la présence de MPs dans les produits issus de la pêche et de l'aquaculture, dont la contamination en MPs n'est plus à démontrer (Smith et al., 2018).

### 3.2.1. La présence de MPs et additifs dans les produits de la pêche et de l'aquaculture

L'utilisation à outrance de plastiques et leur présence dans l'environnement a entraîné la contamination du milieu marin en MPs. L'ingestion de MPs a été recensée pour plus de 220 espèces différentes. Parmi elles, 58% représentaient des espèces commercialisées et consommées par l'Homme (Baechler et al., 2019b; Barboza et al., 2018; Danopoulos et al., 2020; De Witte et al., 2014; EFSA, 2016; GESAMP, 2015; Hantoro et al., 2019; Lusher et al., 2017; Rochman et al., 2015; UNEP and Kershaw, 2016; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). L'étude de (Rochman et al., 2015) sur l'investigation de MPs dans des espèces aquatiques consommées (de poissons et bivalves), a montré que 55 à 67% des espèces retrouvées sur un marché (Indonésie et Californie) étaient contaminées par les MPs.

L'ingestion de microplastiques a été documentée chez de nombreuses espèces de produits de la mer, incluant des poissons (Akhbarizadeh et al., 2019; Barboza et al., 2020b; Boerger et al., 2010; Campbell et al., 2017; Hipfner et al., 2018; Liboiron et al., 2016; Peters et al., 2017; Phillips and Bonner, 2015; Rochman et al., 2015; Rummel et al., 2016), des bivalves (*e.g.* moules, huîtres, palourdes, ) (Baechler et al., 2019a; Brillant and MacDonald, 2000; Davidson and Dudas, 2016; Gaspar et al., 2018; J Li et al., 2016; J Li et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014; Murphy, 2018; Rochman et al., 2015; Santana et al., 2016; Van Cauwenberghe et al., 2015; Waite et al., 2018; Zhao et al., 2018), et autres crustacés et invertébrés (*e.g.* crevettes, écrevisses, homards, concombres de mer, crabes) (Akhbarizadeh et al., 2019; Devriese et al., 2015; Graham and Thompson, 2009; Leslie et al., 2017; Potocka et al., 2019; Taylor et al., 2016).

La quantité de MPs retrouvés dans les organismes échantillonnés varie dans la littérature, avec, outre les différences de localisation des échantillonnages, de grandes différences de techniques analytiques qui complexifient la comparaison des résultats. A titre d'exemple, et sans prendre en compte ces différences, le nombre de MPs/g de poids frais (pf) dans les moules varie entre 0,2 et 13,1 MPs/g, dans des échantillons de moules (*M. edulis*) provenant de la mer du Nord (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014) et (Leslie et al., 2017). Parmi les études concernant les huîtres (*C. gigas*), le nombre de MPs dans les individus varie entre 0,18 MPs/g pf (estuaire, Océan Atlantique) (Phuong et al., 2018), et 10,9 MPs/g pf (estuaire, mer du Nord) (Leslie et al., 2017). Les études compilées dans la review de (Danopoulos et al., 2020) ont comptabilisé une moyenne de 0,57 MPs/g de chair fraîche aussi bien pour les moules que pour les huîtres ( $\pm$  0,15 et 0,36 respectivement) (Danopoulos et al., 2020). L'étude de Van Cauwenberghe and Janssen (2014) a aussi démontré un impact de la dépuración des moules et des huîtres sur le nombre de MPs dénombré dans les individus. En effet, les auteurs ont dénombré une moyenne de 0,36 et 0,47 MPs/g respectivement pour les moules et les huîtres avant dépuración. Après 3 jours de dépuración, les auteurs ont observé une diminution du nombre de MPs avec une moyenne 0,24 et 0,35 MPs/g pour les moules et les huîtres, respectivement, avec une taille de particules



majoritaire (50%) entre 5 et 10  $\mu\text{m}$  (seuil de coupure de 5  $\mu\text{m}$ ). Le temps de dépuración a permis aux organismes d'éliminer les plus grosses particules. Concernant le nombre de MPs échantillonnés dans les poissons, les valeurs varient entre 0,03 MPs/individus (pour *Atherinella brasiliensis*, un poisson benthique pêché dans un estuaire au Brésil) (Vendel et al., 2017) et 9,4 MPs/individu (pour *Scomber japonicus*, un poisson pélagique pêché dans la mer Méditerranée) (Güven et al., 2017). Ces valeurs concernent l'analyse du tractus gastro-intestinal des individus, qui est la partie la plus souvent analysée (Hantoro et al., 2019) mais non disponible pour le consommateur final (l'Homme) sauf dans le cas des poissons consommés entiers (e.g. sardines).

La comparaison du taux de MPs ingéré par les bivalves sauvages ou issus de l'aquaculture montre des résultats différents selon les études. Aucune différence entre ces deux pratiques n'a été observée chez la palourde Japonaise (*Venerupis philippinarum*) dans l'étude de (Davidson and Dudas, 2016). D'autres études ont cependant observé des disparités : la moule bleue pêchée dans des eaux chinoises contenait plus de MPs que des moules élevées en aquaculture (J Li et al., 2016), alors que Van Cauwenberghe et Janssen ont remarqué que les moules élevées en aquaculture contenaient des concentrations en microfibres plus élevées que celles pêchées en mer (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Similairement, une autre étude a observé plus de MPs dans les moules d'élevage que dans les moules sauvages, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les moules d'élevage se développent sur des supports en plastique (i.e. PP) (Mathalon and Hill, 2014). Des études plus exhaustives adressant l'ensemble du spectre de taille des particules ainsi que plusieurs espèces et structures d'élevage sont nécessaires pour renseigner convenablement cette question.

Les exemples précédents ont montré la présence de microparticules de plastiques dans une large variété de produits de la pêche et de l'aquaculture. Par ailleurs, les grandes concentrations en MPs sont le plus souvent retrouvées dans le système digestif et les branchies des organismes (Danopoulos et al., 2020; Lusher et al., 2017), qui sont aussi les parties les plus fréquemment analysées, ce qui oriente ces études du côté environnemental plutôt que sécurité sanitaire des aliments. Néanmoins, ces parties (i.e. système digestif, branchies) sont généralement retirées avant consommation, ce qui rendrait l'exposition aux MPs, via la consommation de poissons, négligeable (Devriese et al., 2015; Lusher et al., 2017). En effet, l'étude de (Devriese et al., 2015) a comptabilisé un nombre de particules moyen de  $0,75 \pm 0,53$  MPs/g de chair fraîche dans une crevette entière alors qu'aucune particule de MPs n'a été trouvée après les avoir décortiquées. Ceci suggère que la partie des crevettes consommée serait dépourvue de MPs et que la majorité des MPs se situeraient dans la tête et les branchies, qui sont quasi-totalement enlevées avant consommation ce qui limite ainsi l'exposition des consommateurs. A contrario, les bivalves (moules et huîtres) et les petits poissons (sardines ou anchois) sont consommés entiers. De ce fait, la contamination en MPs via la consommation de ces produits serait plus importante (GESAMP, 2015).

### 3.2.2. L'ingestion de MPs via la consommation de produits de la pêche

L'exposition de l'Homme aux MPs est complexe à évaluer. De manière générale, les voies majoritaires d'exposition de l'Homme aux MPs sont l'ingestion ainsi que l'inhalation (Hale et al., 2020). Concernant l'ingestion, une étude a reporté que l'exposition de l'Homme aux MPs via le dépôt de microparticules durant la préparation des repas (*i.e.* entre 13 731 et 68 415 MPs/personne/an) était significativement supérieure à l'ingestion de MPs via la consommation de produits de la pêche contaminés (*i.e.* environ 4 620 MPs/personne/an) (Catarino et al., 2018). Néanmoins plusieurs études mettent en évidence que les produits de la mer sont une voie non négligeable d'exposition au MPs (van Raamsdonk et al., 2020).

Comme mentionné dans la partie précédente, la consommation de produits de la pêche augmente chaque année. Et la consommation de bivalves (moules et huîtres) est parmi la plus élevée (**Figure 5**). De ce fait, les Hommes sont inévitablement exposés aux MPs via la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture. L'estimation des valeurs d'ingestion de MPs via la consommation de produits de la mer est encore hasardeuse et varie entre les études. Par exemple, en combinant les données de la consommation en produits de la pêche de la population mondiale et les données de concentration en MPs dans ces produits, Danopopoulos et al., ont extrapolé et estimé une valeur d'ingestion de MPs annuelle allant jusqu'à 27 825 particules de MPs/personne via l'ingestion de mollusques, jusqu'à 17 716 via l'ingestion de crustacés et jusqu'à 8 323 via l'ingestion de poissons (Danopoulos et al., 2020). Conformément aux deux recommandations européennes en vigueur pour la consommation de poissons selon l'âge d'un individu, une autre étude a estimé que l'apport de MPs par la consommation de poisson sur la base de trois espèces de poissons sauvages, *i.e.* le bar, le chinchard, et le maquereau espagnol, varie de 518 à 3 078 MPs/personne/an (Barboza et al., 2020b). Finalement, d'après FAO (2020a), la quantité maximale de MPs ingérée via la consommation de produits de la pêche (tout confondu) serait de 53 864 MPs/personne/an tous pays confondus, sans prendre en compte les disparités de consommation entre les pays comme abordé dans la partie 3.1. Ces chiffres sont à prendre avec du recul, notamment concernant l'ingestion de MPs via la consommation de poisson. Ces extrapolations prennent en compte différentes études ayant échantillonné divers tissus des organismes, dont la majorité porte sur le tractus digestif qui est généralement retiré avant consommation (hormis pour les petits poissons) (cf. partie 3.2.1). De ce fait, dans ces études de compilations de données, l'estimation de l'ingestion de MPs par la consommation de poissons serait alors surestimée.

### 3.2.3. Les impacts liés à l'ingestion de MPs via la consommation de produits de la pêche

Comme évoqué partie 2.2., les MPs peuvent être une menace pour la santé humaine sous différents aspects : une menace physique, chimique et/ou biologique. De ce fait, l'intérêt des études concernant l'ingestion de MPs via l'alimentation et leur toxicité est grandissant.

Il y a un manque d'information sur le devenir des MPs dans le corps humain après ingestion. La majorité des études sur le sujet porte sur la translocation (ou absorption) et la distribution des MPs, alors que très peu d'informations ne sont disponibles sur le métabolisme et l'excrétion (Lusher et al., 2017). Après l'ingestion, la majorité des MPs (>90%) des micro- et nanoparticules de plastiques seraient excrétés par le corps humain dans les fèces (EFSA, 2016; Schwabl et al., 2019; Wright and Kelly, 2017). La taille des particules est l'un des facteurs les plus importants qui détermine l'ampleur, les risques et le devenir des MPs dans le corps humain après l'ingestion. En effet, les particules d'une taille supérieure à 150  $\mu\text{m}$  ne peuvent passer la barrière de l'épithélium intestinal (Hussain et al., 1997) mais peuvent entraîner une inflammation locale et affecter les microbes intestinaux (Hirt and Body-Malapel, 2020). Même si les modes de translocations des microparticules vers les organes supérieurs ne sont pas clairs (Galloway, 2015), plusieurs études ont mené des tests en laboratoire sur rongeurs notamment et ont reporté une translocation de MPs de tailles entre 4 et 50  $\mu\text{m}$  de l'épithélium intestinal et un transport vers différents organes (Dong et al., 2023). Plusieurs études ont cependant mentionné que la translocation intestinale des MPs serait faible. En effet, dans l'étude de Carr et al., 2012 menée sur des rongeurs, le passage des MPs (seuil de taille maximal : 2  $\mu\text{m}$ ) à travers les parois de l'intestin serait seulement entre 0,04 à 0,3% de la dose de MPs administrée (Carr et al., 2012). Une fraction encore plus petite, *i.e.* 0,1%, contenant des MPs d'une taille de 10  $\mu\text{m}$ , serait capable de passer par la circulation et passer la barrière placentaire (Barboza et al., 2018). Par ailleurs, la petite taille des nanoplastiques leur permet de pénétrer plus profondément dans les organes. Les données issues d'études animales ont montré qu'une fois absorbés, les nanoplastiques peuvent se propager vers d'autres organes en traversant la barrière hémato-encéphalique (Prust et al., 2020), avec une absorption préférentielle pour les petite particules (de 50 à 100 nm) par rapport aux plus larges (300 – 3000 nm) (Galloway, 2015).

Au-delà des études sur la translocation et la détection des MPs dans certains tissus biologiques et fluides humain (*e.g.* poumons, sang, placenta, méconium) (Amato-Lourenço et al., 2021; Braun et al., 2021; Leslie et al., 2022; Ragusa et al., 2021), peu d'études sont disponibles sur l'impact des MPs sur la santé humaine. La gravité des effets néfastes résultant d'une exposition dépend de la nature et de la formulation du produit, des caractéristiques de l'exposition et de la sensibilité individuelle. Des recherches préliminaires ont démontré plusieurs impacts potentiellement inquiétants : perturbation du microbiome intestinal (van Raamsdonk et al., 2020), transfert via le sang et vers les organes

secondaires (Deng et al., 2017; des Rieux et al., 2005; Hodges et al., 1995), toxicité intestinale et hépatique et des réactions inflammatoires anormales (Chang et al., 2020), neurotoxicité (Prust et al., 2020), changements dans les profils métaboliques, cytotoxicité et stress oxydatif (Chang et al., 2020), immunotoxicité (Lomer et al., 2002), altération de l'expression des gènes et génotoxicité (Wang et al., 2020). Plusieurs reviews ont aussi été publiées sur le sujet (Barboza et al., 2018; Campanale et al., 2020; Danopoulos et al., 2020; Sharma and Chatterjee, 2017; Smith et al., 2018; Wright and Kelly, 2017). Cependant, de tels effets n'ont pas encore été documentés chez l'Homme *in vivo* mais uniquement *in vitro* sur des modèles cellulaires ou sur des modèles mammifères de rongeurs (Lusher et al., 2017).

Au-delà des potentiels impacts « physiques » des particules de plastique, les effets néfastes de l'ingestion de MPs peut aussi être attribuée à la présence et la migration de molécules chimiques toxiques qui sont associées aux MPs, *i.e.* les additifs plastiques et les potentiels contaminants organiques adsorbés à la surface des particules (Wright and Kelly, 2017). Pour ce travail, seuls les additifs plastiques organiques ont été considérés.

### 3.3. L'exposition de l'Homme aux additifs plastiques organiques

La toxicité des APOs les plus utilisés a été évoquée et démontrée dans de nombreuses études avec notamment des effets de perturbation endocrinienne par des molécules telles que le BPA, les RFB (HBCD, PBDE, TBBPA), et les phtalates (Halden, 2010; Meeker et al., 2009; Talsness et al., 2009). Ce sujet a déjà été abordé dans la partie 1.2.1. La présence de molécules utilisées en tant qu'additifs plastiques dans le corps humain a été documentée dans différentes études. Des alkylphénols ont été identifiés dans du sang humain, de l'urine, du fluide amniotique et du lait maternel (Calafat et al., 2008). Le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies a publié un rapport sur l'exposition de l'Homme à des contaminants environnementaux et a indiqué avoir détecté plusieurs molécules de phtalates dans les urines de la majorité de la population des Etats-Unis (CDC and Prevention, 2005). Ceci indique une exposition généralisée des phtalates dans la population, mais peut ne pas refléter entièrement le niveau d'exposition à long terme des individus (Meeker et al., 2009).

L'exposition de l'Homme aux substances utilisées comme additifs plastiques est multiple, et se produit par le contact avec des produits cosmétiques, des produits plastiques, des produits ménagers, par les voies respiratoires ou via l'alimentation. Ces molécules peuvent en effet menacer la sécurité sanitaire en migrant vers le corps humain et avoir des effets négatifs sur la santé (Campanale et al., 2020 ; Huang et al., 2021 ; Wright and Kelly, 2017). La contamination par les additifs plastiques via les aliments est d'ailleurs la voie considérée comme étant majoritaire et participerait jusqu'à 99% de la

contamination (Halden, 2010). Par exemple, la migration de certaines molécules d'APOs a été démontrée à partir de bouteilles d'eau minérale. L'Irgafos® 168, un antioxydant a été détecté en grande quantité dans 32 échantillons d'eau minérale en bouteilles de 21 marques différentes (Oßmann et al., 2018). (Loyo-Rosales et al., 2004) ont observé une migration de nonylphénols des bouteilles plastiques vers l'eau. D'autres études ont observé la migration de BPA à partir de bouteilles plastiques et de biberons en PC sous de très fortes températures (*i.e.* entre 70 °C et 100 °C) (Cao and Corriveau, 2008; Maia et al., 2009; Maragou et al., 2008).

*Exposition associée à la présence et l'ingestion de MPs dans les produits de la pêche*

Si l'on se concentre sur l'implication de produits de la pêche et de l'aquaculture dans l'exposition de l'Homme aux APOs, plusieurs études mentionnent le potentiel transfert de ces molécules *via* la consommation de produits de la mer contaminés (Danopoulos et al., 2020; Lusher et al., 2017; Wright and Kelly, 2017). Barboza et al. (2020a) a signalé une lixiviation de molécules de bisphénols (A, B et E) des MPs vers le foie et les muscles de divers poissons commerciaux sauvages, et que les concentrations en bisphénols étaient corrélées à une ingestion de MPs plus importante par ces poissons. Ces résultats suggèrent des risques potentiels d'exposition des humains aux MPs et aux additifs, associés à leur consommation de poissons.

Quelques preuves ont été apportées sur la désorption de contaminants chimiques et la libération d'additifs plastiques par la digestion après ingestion de MPs dans diverses espèces (*e.g.* poissons, oiseaux) (Batel et al., 2016; Coffin et al., 2019). Dans un modèle biodynamique proposé par (Koelmans et al., 2014) pour estimer la lixiviation du BPA et du nonylphénols de MPs ingérés par la morue (*Gadus morhua*), les résultats ont permis de mettre en avant que l'ingestion était une voie non négligeable de contamination à ces APOs. Quelques études *in vitro* de simulation de condition gastro-intestinale de poissons et d'oiseaux ont montré que les conditions intestinales pouvaient en effet intensifier et accélérer la lixiviation d'APOs (*e.g.* bisphénols, phtalates) (Coffin et al., 2019; Guo et al., 2020; Guo et al., 2019) engendrant des effets œstrogéniques (Coffin et al., 2019). Cependant, des données similaires sur le devenir des additifs plastiques dans le système digestif humain, *via* des expériences de simulation manques. Très peu d'études éclairant sur l'exposition réelle à ces molécules ont été publiées sur le sujet. En prenant en compte la concentration moyenne des additifs inclus dans les plastiques, *i.e.* 4% du poids du plastique pour le BPA par exemple, et la masse calculée de MPs retrouvée dans une portion de moule de 225 g (*i.e.* 7 µg), l'EFSA (2016) en a déduit qu'environ 0,28 µg de BPA serait ingéré par une personne après avoir consommé un plat de moule (EFSA, 2016). Cependant, les additifs sont ajoutés avec des proportions différentes dans les plastiques. Par exemple, certains plastifiants peuvent être ajoutés à hauteur de 70% (Hahladakis et al., 2018), ce qui induirait une exposition plus importante.

L'implication des MPs dans la contamination en additifs est très compliquée à estimer au vu de l'absence de données disponibles publiquement sur leur formulation et de la diversité des molécules et de leur omniprésence. En effet, les plastiques et MPs ne représentent pas la seule voie d'exposition aux additifs. Il existe de nombreuses autres sources d'exposition à ces mêmes molécules chimiques et les MPs pourraient d'ailleurs représenter une contribution relativement faible par rapport au risque total (GESAMP, 2015). L'implication des MPs dans le transfert de ces polluants vis-à-vis des autres sources potentielles (eau, particules dans l'air) est encore un questionnement important (Campanale et al., 2020). Dans le même sens, à travers des articles d'opinion scientifique, l'EFSA conclue que pour les populations adultes européennes, le risque sanitaire lié à l'exposition actuelle à diverses molécules (PBB, PBDE, HBCD, TBBPA) *via* l'alimentation, ne soulève pas de problème pour la santé. La seule exception porte sur l'exposition des enfants. Cependant l'évaluation des risques pour de nombreuses molécules d'additifs déjà utilisées ou émergentes reste manquante (EFSA, 2016). De ce fait, dû à ce manque de données et d'études expérimentales, le risque de toxicité lié à l'ingestion de microparticules de plastiques et/ou de produits de la mer contaminés par des APOs et MPs est compliqué à évaluer. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étayer notre connaissance sur les niveaux d'expositions et les dangers associés aux MPs et leurs contaminants sur la santé humaine, afin d'établir une évaluation des risques liés à l'impact de l'ingestion de MPs.

#### 4. Les méthodes d'extraction et de caractérisation des APOs

La présence de certains additifs toxiques dans des produits consommés par l'Homme peut poser un problème sanitaire. Cependant, trop peu de données sont disponibles pour mieux estimer la contamination de ces produits et donc appréhender le danger pour le consommateur, lié à la présence d'additifs dans les produits de la pêche. Comme mentionné précédemment, un grand frein se trouve au niveau de la connaissance de l'identité chimique des additifs pouvant migrer au sein des matrices environnementales ainsi que leurs quantités. Lever ce frein repose sur l'utilisation et le développement de méthodes analytiques permettant de détecter et de quantifier les additifs plastiques.

Compte tenu de la complexité de la composition des matériaux plastiques, l'échantillonnage et l'analyse des additifs est un véritable défi pour plusieurs raisons qui sont exposées dans le (Tableau 7). Il existe un nombre de polymères, d'additifs et de formulations très vaste et la liste ainsi que les proportions exactes des molécules ajoutées aux plastiques sont souvent tenues secrètes par le producteur et transformateur. De plus, les polymères contiennent souvent des mélanges d'isomères, des mélanges d'additifs ayant des propriétés et caractéristiques différentes, ainsi que des composés additionnels pouvant compliquer et interférer avec l'analyse des additifs (*i.e.* NIAS, oligomères). La concentration des additifs joue aussi un rôle important, notamment dans le choix de la méthode d'extraction et d'analyse, par exemple des additifs présents à de fortes concentrations comme les plastifiants (jusqu'à 70% m/m) vont être facilement extraits et identifiés, contrairement aux stabilisateurs UVs (jusqu'à 3% m/m). Enfin, la nature de la matrice polymérique joue également un rôle important dans la séparation polymère-additif et dans le choix de la méthode.

**Tableau 7 : Principaux facteurs influençant et expliquant la complexité de l'analyse des additifs plastiques (Crecely and Day, 1998; Hahladakis et al., 2018; Subramanian, 2013).**

Paramètres	Impact(s) sur l'analyse
Variété des matrices polymériques et propriétés différentes ( <i>e.g.</i> cristallinité, solubilité)	- Conditionne la façon dont les additifs peuvent (ou non) être extraits - Interférences possibles entre polymères et additifs
Variété des additifs utilisés (organiques et inorganiques) avec des paramètres physico chimiques différents ( <i>e.g.</i> masse moléculaire, volatilité, polarité)	- Détermine la façon dont les additifs peuvent (ou non) être extraits
Large gamme de concentration selon les additifs ou concentrations inconnues	Influence le choix du type de méthode ( <i>i.e.</i> analyse de traces)
Pureté des polymères et additifs ( <i>i.e.</i> NIAS, produits de dégradation, monomères et oligomères résiduels)	- Complexifient l'analyse - Interférences possibles
Différences de réactivité et stabilité thermique selon les additifs et les polymères	Influence de choix du type d'extraction et d'analyse

L'analyse des additifs plastiques se déroule en deux étapes : (i) l'extraction des additifs à partir de la matrice polymérique, et (ii) l'analyse (séparation et identification) des composés via des techniques appropriées notamment les techniques de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) (Subramanian, 2013). Parmi les méthodes d'analyse des additifs plastiques, deux catégories sont distinguées : les méthodes avec ou sans préparations de l'échantillon, autrement dit les analyses indirectes ou directes (Bart, 2005).

#### 4.1. Les méthodes indirectes – extraction par des solvants

Au sein d'un matériau plastique, la faible proportion des additifs par rapport à la proportion des polymères est l'une des raisons pour laquelle il est nécessaire de préparer l'échantillon pour séparer les additifs du polymère. En effet, la présence de grandes quantités de substances interférentes indésirables dans la matrice (polymère, oligomères) va masquer le signal émis par les additifs lors de leur analyse ou fortement complexifier leur identification (Bart, 2005).

Les composés organiques peuvent être séparés du polymère par extraction des additifs, ou via la dissolution des polymères. Les méthodes les plus employées sont les extractions par solvants telles que les techniques de macération, d'extraction au Soxhlet, de dissolution-reprécipitation ou des techniques d'extractions accélérées, *e.g.* à reflux, assistées par ultrasons ou micro-ondes (Bridson et al., 2021). Toutes ces méthodes ont le même objectif : celui de transférer les additifs dans la phase liquide afin de les rendre accessibles à diverses techniques analytiques chromatographiques liquides ou gazeuses, spectroscopiques ou spectrométriques (Bart, 2005). Ces techniques comptent parmi les plus utilisées dans les laboratoires et sont bien maîtrisées pour l'identification et la quantification des APOs et permettent généralement un important taux d'extraction des additifs (Bart, 2005). Cependant, leur application nécessite un grand nombre d'étapes de préparation de l'échantillon et de manipulation (extraction, dissolution, centrifugation, décantation, filtration, évaporation, précipitation, etc.) et implique souvent l'utilisation de conditions agressives (chaleur) et d'une grande quantité de solvants organiques généralement toxiques (*e.g.* hexane, dichlorométhane (DCM), acétonitrile) (Bart, 2005; Bridson et al., 2021). Ces étapes de préparation doivent être réalisées avec soin pour ne pas dégrader ou volatiliser des additifs d'intérêt. L'efficacité de l'extraction dépend en partie du type d'additif, des polymères et des solvants utilisés. Par exemple, l'efficacité de l'extraction au Soxhlet (au DCM) des PCB et des alkylphénols à partir du PE et du PP étaient respectivement >90% et >75%. De la même façon, l'extraction (DCM/Hexane) du BDE-209 dans du PE était de 98% (Sun et al., 2019) alors qu'elle était <15% pour le PP (DCM) (Hirai et al., 2011). La sélection des solvants est un paramètre clé et limitant pour ces techniques d'extraction par solvants. Un compromis doit être trouvé entre l'efficacité de l'extraction, selon la nature du polymère et des additifs, et la stabilité des



additifs dans les conditions d'extractions choisies. Concernant les additifs, ce choix peut s'avérer complexe si la détection de composés inconnus est envisagée (Bart 2005).

Ces nombreuses étapes sont souvent chronophages et peuvent engendrer des contaminations, des incertitudes, et des biais. En effet, les temps d'extractions relativement longs et agressifs souvent suivis par des étapes de concentration peuvent engendrer une altération et une perte des composés d'intérêt les plus volatiles (Bart, 2005; Subramanian, 2013). La tendance actuelle est donc de minimiser la manipulation de l'échantillon et l'utilisation de produits chimiques, ainsi que d'harmoniser les techniques. Dans son livre, Bart (2005) mentionnait même que « la préparation de l'échantillon idéale serait de ne pas en faire du tout », il présente aussi dans un tableau des prérequis pour une méthode d'extraction idéale (**Tableau 8**). Des méthodes plus directes permettent alors de minimiser ou supprimer la manipulation et les étapes de préparation de l'échantillon, ce qui diminue les risques de contamination et accélère considérablement la procédure d'analyse.

**Tableau 8 : Liste d'exigences pour une méthode d'extraction idéale (issus de Bart et al., 2005)**

<b>Exigences pour une méthode d'extraction idéale</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode de routine rapide</li> <li>• Simple sans besoin d'adaptation et d'optimisation fréquente</li> <li>• Sélective</li> <li>• Peu coûteuse (consommables)</li> <li>• Large couverture d'analytes</li> <li>• Pas d'altération des analytes (dégradation, transformation)</li> <li>• Récupération totale des analytes d'intérêts</li> <li>• Permet d'obtenir un échantillon prêt à être analysé directement (pas d'étape de préparation ou de pré-concentration)</li> <li>• Gamme dynamique linéaire de la courbe d'étalonnage</li> <li>• Ne génère pas ou peu de déchets de laboratoire</li> <li>• Portative</li> </ul>

## 4.2. Les méthodes directes

Parmi les méthodes directes les plus utilisées pour l'analyse des APOs, on distingue les méthodes non-destructives (méthodes spectroscopiques) et les méthodes destructives (méthodes d'extraction thermique ou de thermo-désorption (TD) comme le laser ou la pyrolyse) (Bart, 2005; Bridson et al., 2021).

### 4.2.1. Les méthodes spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques les plus couramment utilisées pour étudier les additifs et les polymères sont la spectroscopie infrarouge (IR), le Raman, l'ultra-violet (UV), la mesure de fluorescence, ou la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Bart, 2005). Ce sont des méthodes rapides et applicables directement à partir d'un échantillon solide. Les spécificités pour un type d'additif donné diffèrent selon les techniques et leur gamme de longueur respectives ; (Bart, 2006) classe la sensibilité des techniques spectroscopiques de la sorte : spectroscopie UV > IR > Raman. Le **Tableau 9** regroupe les caractéristiques principales communes des analyses spectroscopiques les plus utilisées pour l'analyse des additifs (*i.e.* IR, UV et Raman).

**Tableau 9 : Avantages et limites communs aux analyses spectroscopiques IR, UV et Raman. (Bart, 2006; Crecey and Day, 1998).**

<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Techniques de routine</li> <li>• Peu ou pas de préparation de l'échantillon (<i>e.g.</i> broyage, formation d'un film)</li> <li>• Applicable à des échantillons de petite taille et faible quantité (10 - 1000 <math>\mu\text{m}</math>)</li> <li>• Simple (si réalisé sur des grosses particules)</li> <li>• Peu coûteuse</li> <li>• Rapide (&lt; 2min)</li> <li>• Vaste gamme d'application</li> </ul>
<p><b>Limites :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu spécifique (notamment pour les matrices complexes comme les polymères avec un mélange d'additifs)</li> <li>• Difficulté de mise en place pour des petites particules (MPs)</li> <li>• Difficulté pour l'identification de composés inconnus</li> <li>• Nombreuses interférences avec les polymères, <i>i.e.</i> effet de dilution de la matrice, avec les additifs inorganiques (<i>e.g.</i> pigments), avec des impuretés</li> <li>• Analyse parfois impossible dû à la divergence des faisceaux selon la cristallinité des polymères</li> <li>• Quantification limitée. Possibilité d'analyser des additifs présents en faible quantité (0,1% m/m)</li> </ul>

Une des plus grandes limites de ces techniques est la présence d'interférences polymères-additifs avec un signal de la matrice très élevé qui va masquer les signaux plus faibles des additifs et/ou fortement complexifier la lecture du spectre obtenu. De ce fait, ces méthodes ne seront applicables que

sur les additifs ayant un signal bien distinct (fortes bandes d'absorption), dans des régions où le polymère aura peu ou pas d'absorption. Ces techniques peuvent nécessiter des outils de chimiométrie pour réaliser une déconvolution<sup>8</sup> du signal.

L'identification des additifs organiques peut aussi être altérée par la présence d'impuretés ou autres additifs inorganiques (*i.e.* pigments) à fortes absorbances sur des bandes communes. Ces limitations peuvent être résolues par des étapes préalables d'extractions sélectives par solvant, en complétant ces analyses avec des analyses chromatographiques, ou en soustrayant le spectre d'un polymère de référence pour retirer les interférences matricielles et observer les composés plus minoritaires. Cependant ce type de matériel de référence vierge d'additifs n'est pas toujours disponible, ni commercialisé (Bart, 2006). De plus, ces méthodes ne sont pas appropriées pour l'identification de composés inconnus à cause de leur manque de spécificité (Bart, 2006; Lee and Gioia, 2008).

#### 4.2.2. Les méthodes d'extraction thermiques

Les méthodes d'extraction thermique sont des approches simples pour analyser des additifs organiques à partir d'un matériau plastique. Le principe de ce type d'analyse est de chauffer l'échantillon à une certaine température pour désorber, *i.e.* volatiliser, les additifs, puis de les séparer et les identifier par une technique de séparation et d'identification appropriée, généralement la GC-MS (Subramanian, 2013). L'efficacité d'une désorption thermique d'additif à partir d'une matrice polymérique dépend des facteurs déjà évoqués en début de la partie 4, auxquels s'ajoutent (i) la taille et la surface de l'échantillon, *i.e.* l'efficacité de désorption est inversement proportionnelle à la taille de l'échantillon, (ii) la température sélectionnée, et (iii) la pression de vapeur<sup>9</sup> des additifs (Lattimer and Harris, 1985). La désorption des additifs est la voie la plus directe pour identifier un additif sans avoir d'interférences avec la matrice polymérique. Son application idéale concerne des molécules volatiles ayant une pression de vapeur suffisamment élevée afin d'être vaporisée, tout en chauffant l'échantillon à une température inférieure à la température de décomposition de la matrice polymérique. C'est heureusement le cas pour un grand nombre d'additifs organiques (Bart, 2006; Lattimer and Harris, 1985).

---

<sup>8</sup> La déconvolution spectrale est un outil de traitement de signal qui permet de décomposer un spectre en trois composantes (e.g. un continuum, des bandes d'absorption individuelles et le bruit). L'opération consiste à reproduire un signal à partir de sa mesure après réduction de l'influence du bruit des données et des interférences, de sorte que la résolution du spectre soit améliorée et que l'incertitude de l'interprétation des résultats soit réduite. La technique de déconvolution est souvent utilisée pour analyser et la présence et la proportion de différents composés dans un mélange complexe (Blackledge, 2005; Jiang et al., 2019).

<sup>9</sup> La pression de vapeur est la pression à laquelle les phases liquide et gazeuse d'un composé sont en équilibre (à une température donnée). Plus la pression de vapeur d'un composé est élevée, plus il se volatilise rapidement.

Une des techniques pouvant être utilisée est la pyrolyse couplée à une chromatographie gazeuse suivie d'un spectromètre de masse (Py-GC-MS). La Py-GC-MS est utilisée pour caractériser la composition chimique et la structure de composés volatiles et non-volatiles. La caractérisation est faite via l'analyse des produits de désorption ou de dégradation des composés après une ou plusieurs étapes de chauffage de l'échantillon. Les températures appliquées peuvent aller d'environ 250 °C à 1100 °C. Cette technique a été le plus souvent employée pour l'analyse de polymères via l'identification de fragments pyrolytiques caractéristiques après chauffage de l'échantillon à de fortes températures proches de 600 °C (Fries et al., 2013; Tsuge et al., 2011). Un pyrolyseur peut aussi avoir un usage détourné et effectuer de la désorption thermique (Py/TD) en chauffant un échantillon à des températures sub-pyrolytiques et alors permettre l'analyse des additifs indépendamment des polymères (Herrera et al., 2003). Cette double fonctionnalité est un gros avantage de la pyrolyse qui permet de mener une analyse très complète d'un matériau plastique en ayant successivement une identification des additifs, suivie par la caractérisation du polymère.

### 4.3. Identification et quantification des additifs plastiques en Pyrolyse-GC-MS.

Cette partie décrivant la plus-value de la Py-GC-MS dans l'analyse des additifs plastiques a fait l'objet d'une revue bibliographique (**Article 1**) publiée dans le journal *Science of the total environment*.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145073>

#### 4.3.1. Objectif de l'étude et démarche bibliographique

Dans le but d'établir un état de l'art sur l'utilisation de la Py-GC-MS dans l'analyse des APOs, une vaste recherche bibliographique a été réalisée à l'aide de bases de données et de moteurs de recherche scientifiques (Scopus, Google Scholar, Science Direct) par la recherche de différents mots clés, *i.e.* « plastic additives », « polymers », « double- and multi-shot pyrolysis GC/MS », « thermal desorption », et grands thèmes tels que les additifs plastiques et leur propriétés, les techniques analytiques pour les APOs ainsi que l'application de la pyrolyse pour l'analyse des polymères plastiques et des APOs. Au total, 71 articles, datant de 1983 à Août 2020, ont été compilés et comparés dans le but de formuler un état des lieux complet sur le sujet.

Cette revue décrit le principe, les applications, les méthodes, les plus-values et les limites de la Py-GC-MS dans l'identification et la quantification d'APOs.

## 4.3.1. Article 1

**Identification and quantification of plastic additives using Pyrolysis-GC/MS: A review**

**Fleurine Akoueson<sup>1, 2</sup>, Chaza Chbib<sup>3</sup>, Sébastien Monchy<sup>3</sup>, Ika Paul-Pont<sup>4</sup>, Périne Doyen<sup>2</sup>, Alexandre Dehaut<sup>1</sup> & Guillaume Duflos<sup>1</sup>**

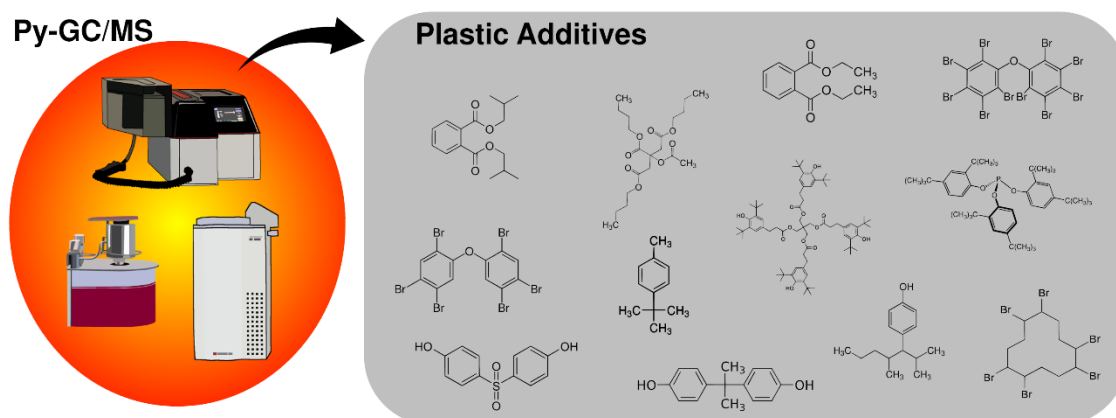
<sup>1</sup> ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

<sup>2</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, EA 7394, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Uni. Liège, F-62200, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Univ. Lille, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F 62930 Wimereux, France

<sup>4</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

Corresponding Author: Guillaume Duflos - guillaume.duflos@anses.fr

**Graphical abstract****Abstract**

Analysis of organic plastic additives (OPAs) associated to plastic polymers is growing. The current review outlines the characteristics and the development of (multi-step) pyrolysis coupled with a gas chromatography mass spectrometer (Py-GC/MS) for the identification and semi-quantification of OPAs. Compared to traditional methods, Py-GC/MS offers advantages like suppressing extensive steps of preparation, limiting contamination due to solvents and the possibility to analyse minute particles. Its key advantage is the successive analysis of OPAs and the polymeric matrix of the same sample. Based on the studied articles, numerous methods have been described allowing identification and, in some case, semi-quantification of OPAs. There is nevertheless no gold standard method, especially given the huge diversity of OPAs and the risks of interferences with polymers or other additives, but, among other parameters, a consensus temperature seems to arise from studies. More broadly, this review also explores many aspects on the sample preparation like weight and size of particles and calibration strategies. After studying the various works, some development prospects emerge and it appears that methodological developments should focus on better characterizing the limits of the methods in order to consider which OPAs can be quantified and in which polymers this is feasible.

**Keywords:**

Organic plastic additives (OPAs); plastic polymers; Py-GC/MS; multi-shot pyrolysis

## 1. Introduction

Pyrolysis-gas chromatography coupled with mass spectrometry (Py-GC/MS) is used to characterize the chemical composition and the structure of volatile and non-volatile compounds (Riess et al., 2000). This characterization is performed under an inert atmosphere (usually using helium), by analysing the thermal degradation products of the compounds obtained after heating the sample to high temperatures, usually between 250°C and 700°C (Fries et al., 2013; Herrera et al., 2003; Kleine-Benne and Rose, 2011; Tsuge et al., 2011; Wang, 2000c). Py-GC/MS is one of the oldest approaches to studying the structure of polymeric systems (Bart, 2001), and has become established as a simple, quick and reliable analytical technique for a range of applications, including the analysis of various chemical aspects of polymeric materials including the characterization of organic plastic additives (OPAs). Various chemical additives are added to polymers during the manufacturing process to modify and improve their physical properties (Fries et al., 2013; Rios Mendoza et al., 2017; Rochman et al., 2019). There are several categories of additives, for instance pigments and dyestuffs to modify colour, antioxidants and UV stabilizers to maintain the inherent properties of the material by providing resistance to heat and aging or to improve resistance to light, and functional agents including flame retardants, anti-static additives, surfactants, and plasticizers. They can be small, volatile and semi-volatile molecules, or large and less or non-volatile compounds (Jansson et al., 2007).

The use of a specific analytical tool such as Py-GC/MS enables to obtain information on the composition of the plastic material, for which there is no clear data on formulation. The molecular information on the polymer, additives, and the mixture additives-polymers will help to extend knowledge on the state of polymer degradation, to establish the link between formulation, properties and degradation (La Nasa et al., 2020), and to target toxic aspects. The analysis of OPAs has grown in importance over the past few decades since the use of certain additives has become a controversial issue as some of them were found to be toxic to human (Yanagisawa et al., 2018). Compared with other detection methods, such as liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) or GC/MS analysis with a solvent extraction (SE) step, Py-GC/MS has the advantage of having a relatively easy and fast sample preparation (Kim et al., 2016; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2017; Maruyama et al., 2015; Odermatt et al., 2003; Yanagisawa et al., 2018). This technique has been applied to the qualitative and semi-quantitative analysis of a large variety of additives in polymers. In addition, for most compounds, analytical pyrolysis offers a major

advantage when it comes to analysing a complex sample: it can identify mixed media and successively analyse both the polymer and the associated OPAs. This is called multi-shot Py-GC/MS, which includes an initial thermal extraction step to characterize the additives and a second flash pyrolysis step to analyse the polymeric matrix (Herrera et al., 2003; Jansson et al., 2007; Kleine-Benne and Rose, 2011).

This paper reviews the studies carried out on OPAs using the analytical Py-GC/MS technique. This literature review, based on 71 articles, identified in scientific databases and search engines (Scopus, Google Scholar, Science Direct). An extended bibliographic research was carried out on plastic additives, pyrolysis techniques, additive properties, the type of analysable molecules and the application of Py-GC/MS to plastic polymers and associated OPAs without targeting any specific additives. Then, a more targeted literature search was carried out by including the following key words: plastic additives, polymers, double- and multi-shot pyrolysis GC/MS and thermal desorption. The studies dated from 1983 up to August 2020. Articles were selected based on the title and the abstract and, often, on the references in those articles. The third step consisted in extracting, compiling, sorting and comparing the information given in the selected studies. This review presents the usefulness of the multi-shot Py-GC/MS technique for the analysis of OPAs and plastic polymers. It also explores the different criteria that need to be taken into account for successful analysis, from the knowledge of additives, polymers and their use, to the understanding of pyrolysis and its analytical parameters.

## 2. Pyrolysis-GC/MS and its contribution to the analysis of plastic additives

The analysis of the chemical compounds added to plastic formulations is complicated. The polymeric matrix is a mixture of molecules: oligomers, additives, and non-intentionally added substances (NIAS) that must be identified using sensitive analytical techniques. Although various analytical techniques can be used to identify plastic additives in polymeric materials, most laboratories and studies use wet chemical techniques to extract additives from the polymers.

To date, many conventional methods for OPA analysis in polymer materials have been published. The majority of them use SE, such as Soxhlet extraction, coupled with GC/MS analysis (Kim et al., 2016; Kudo et al., 2019; Trimpin et al., 2009). SE allows for accurate qualitative and quantitative analysis, but requires complicated, costly, and time-consuming steps as well as large quantities of solvents. These steps are considered problematic because they can introduce errors in the analysis because of those manipulations. The various

potential sources of errors (listed in Randle et al. (2013)) include (1) analysing a non-representative portion of the sample; (2) the risk of losing the targeted analytes during sample preparation; (3) reproducibility problems with the risk of deviations from the method's protocol; and (4) background contamination, coming from glassware, reagents or solvents, which increases with each additional step of the process. Moreover, another downside of SE is that some polymers, especially thermoplastic matrices such as polyethylene (PE) or polypropylene (PP), are insoluble or hardly soluble in some solvents (Bart, 2001; Okoffo et al., 2020; Wang, 2000c). For these reason, SE techniques do not always comprehensively isolate the additives from the polymeric matrix. Recalcitrant polymers usually require high temperatures and, either the final solution is too viscous to go through extraction procedures, or the solvent is very corrosive and presents safety hazards (Wang, 2000c).

Suppressing the extensive sample preparation steps prior to analysis can help to reduce the bias and the labour costs associated with each step. However, without prior separation of the additive from the macromolecular polymeric matrix using wet chemistry, the number of direct analytical methods that can be applied are limited (Bart, 2001). Methods such as Py-GC/MS that can easily analyse plastic additives have gained interest over the past several years. This thermal extraction method can be applied to solid samples when there is no simple way to extract the additive from the solid (Wang, 2000a).

### 2.1. Py-GC/MS for the identification of plastic additives and polymers

Over the last few years, flash pyrolysis has become the most common pyrolysis technique for the analysis of additives. With this method, additives are identified by determining their pyrolysis degradation products (Bart, 2001). One of the first experiments on additive analysis using flash Py-GC/MS was performed by Perlstein and Orme (1985). They identified and semi-quantified some UV-light stabilizers (Tinuvin® 144 (PubChem CID: 93348), Tinuvin® 622 (PubChem CID: 54328974), Tinuvin® 770 (PubChem CID: 164282) and Chimassorb® 944 (PubChem CID: 93418). They also identified an antioxidant, Irganox® 1010 (PubChem CID: 64819) embedded in low-density polyethylene (LDPE) and PP at 770°C, after a dissolution step by using sulfuric acid and methylene chloride. However, in addition to the complicated sample preparation (SE and pre-concentration steps) and the overlapping characteristic peaks, the low recovery rates (72–94%) limit the practicality of the method. Wang (2000c) used the same technique for the identification of some flame retardants and antioxidants at a pyrolysis temperature of 950°C.

The flash pyrolysis technique is problematic for the direct analysis of OPAs in complex polymeric matrices because they are pyrolysed along with the polymer. On the pyrogram, the abundance of polymer fragments is greater than those of the additives. Furthermore, the proportion of additives is not equally distributed among polymer types. Some polymers require different amounts of additives according to their use, *e.g.* polyvinyl chloride (PVC): 73% w/w, PE and PP: 10% w/w and styrenics: 5% w/w (Rochman, 2015). Moreover, the proportion of the different additives within the polymers is also very disparate going from 0.005% to 70%. For example, plasticizers are found in the range of 10 to 70% w/w and most of brominated flame retardants (BFRs) in the range of 3-25% w/w. However, antioxidants or others flame retardants are present in low quantities, from approximately 0.005 to 7% w/w (European chemical agency, 2019; Hahladakis et al., 2018). For this reason, the pyrolysis products from OPAs during flash pyrolysis may be overshadowed by the products generated from the polymer, resulting in a complex mass spectrum analysis that hampers the identification of additive compounds. Thus, to be able to discriminate an additive from the decomposition products of the polymeric matrix, the spectra of the additive or its fragments must differ significantly from those of the polymer fragments.

Pyrolysis analysis can help with this issue, by using a “multi-step” temperature approach that allows investigating the organic additives and the polymeric matrix separately and successively (Derenne and Quéneá, 2015; Fries et al., 2013; Okoffo et al., 2020; Wang, 2000c). This multi-step analysis, more commonly called multi-shot Py-GC/MS (Herrera et al., 2003) or sequential pyrolysis (Kleine-Benne and Rose, 2011), can lead two consecutive analyses of a single sample under different pyrolysis temperatures (Herrera et al., 2003; Kleine-Benne and Rose, 2011; Okoffo et al., 2020; Quéneá et al., 2006; Terán et al., 2009). The polymer sample is directly introduced into the pyrolyser device. The first shot is used to thermally desorb the organic compounds at the surface of the sample or the additives included in the polymers using a specified heating programme. It provides information on additives, regardless of the polymer, through rapid analysis of additives without degrading the polymeric matrix.

The second shot, also called fast or flash pyrolysis, thermally degrades the polymer matrix at higher temperatures (>500°C) and gives data on the polymer only (Herrera et al., 2003; Jansson et al., 2007; Okoffo et al., 2020).

Multi-shot Py-GC/MS has proven to be a good tool for the identification of OPAs and polymers, helping with the identification of additives and simplifying the interpretation of the polymer spectra

by separating the additives detection from the polymers and thermally separating the different families of compounds at different temperature intervals (Académie des sciences, 2021; Dekiff et al., 2014; Fries et al., 2013; Herrera et al., 2003; Jansson et al., 2007; Odermatt et al., 2003). In 2019, Yanagisawa et al. (2019) developed and applied the first screening method for multiple additives, including plasticizers and various families of flame retardants: Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) (PubChem CID: 8295), decabromodiphenylether (decaBDE), Diisobutyl phthalate (DIBP) (PubChem CID: 6782), Di-n-butyl phthalate (DBP) (PubChem CID: 3026), Butyl benzyl phthalate (BBP) (PubChem CID: 2347), Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (PubChem CID: 8343) and Tetrabromobisphenol A (TBBPA) (PubChem CID: 6618).

The chemical nature of the additives needs to be taken into account. For instance, certain OPAs that are polar, unstable, or have high molecular weight and low volatility, such as some flame retardants or some antioxidants and light or UV stabilizers, are more complex to analyse than others (Riess et al., 2000; Yanagisawa et al., 2018). These additives, weakly detectable or even undetectable at a low pyrolysis temperature of 300°C, *i.e.* first-shot temperatures, need to be either derivatized to improve their volatility, or analysed at higher temperatures, *i.e.* approaching flash pyrolysis temperatures, with the risk of making the spectrum analysis difficult due to overlap with the peaks of the pyrolysed polymers (Yanagisawa et al., 2018).

There are a large number of pyrolysates produced during the pyrolysis of the polymeric matrix with complex additives; as a result, interpretation and identification of all components can be rather time consuming (Wang, 2000a). Another pyrolysis approach is evolved gas analysis-mass spectrometry (EGA-MS), which can give complementary information on the thermal features of the compound. EGA-MS provides thermal degradation profiles by thermally separating the materials of a sample, without chromatographic separation. Once the thermal zones of interest are obtained, appropriate pyrolysis temperature can be selected based on the EGA profile. Compounds can be identified according to the mass spectrum information and the ions present in a thermal region, (La Nasa et al., 2018; La Nasa et al., 2021).

Carefully examining specific ions for each additive is the key to achieve simultaneous screening. A good understanding of the pyrolytic behaviour of both the additives and the polymer can help select which fragments and specific ions to target and determine the presence of the molecules of interest (Jansson et al., 2007; Sitholé and Pimentel, 2009). By selecting appropriate quantifier and qualifier ions, all target analytes can be better

visualized, identified, and measured without interfering with each other. The single ion monitoring (SIM) mode of the MS detector is also useful for checking and balancing interferences between the additives and the polymer matrix. These interference noise levels can result in lower abundance of the targeted molecules, due to ion suppression.

Py-GC/MS is now a recognized method for the fast identification and semi-quantification of organic contaminants, including OPAs (Table 1). It provides a well-known advantage: it does not require sample pre-treatment, such as SE (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2017). Analysis can be carried out by simply placing a suitable amount of weighed out sample directly in a pyrolysis sample cup, thereby limiting background contamination (Dekiff et al., 2014; Fries et al., 2013; Kudo et al., 2019; Terán et al., 2009). Although cross-contamination coming from the sample preparation steps can be avoided, particular attention must be paid to the plastic additives already present in laboratory reagents and materials. In 2020, Hermabessiere et al. (2020) conducted a study on the presence of Irgafos® 168 (an antioxidant mainly incorporated in PP and PE) in various laboratory reagents and materials including plastic packaging, caps, bottles, containers, polymer powder, and deionized water and showed that this antioxidant was ubiquitous in the laboratory at high concentrations. To overcome this contamination, with the aim of conducting studies in realistic conditions and preventing certain additives, *e.g.* Irgafos® 168, from interfering with analytical studies, the source of plastic additives should be carefully considered.

Py-GC/MS has another substantial advantage: it can analyse tiny mass amounts of sample, of the order of microgram amounts, usually between 100 and 1000 µg depending on the study, Py-GC/MS has also been used on colloidal fractions presumably containing nanoplastics (<1 µm) (Ter Halle et al., 2017). This level of detection contrasts with other analytical techniques, such as SE methods, that are quite inaccurate at low concentrations and require a higher amounts of sample to surmount detection limits (Bart, 2001). In some cases, Py-GC/MS is the only characterization method that can be used when small amounts of material are available. It is also important to consider that, depending on the type of additive, only a low concentration of additives can be embedded in the polymeric matrix, as mentioned above. The low ranges of concentrations illustrates the critical need for a sensitive method, especially in the case of environmental sample analysis, where OPAs are more likely to be heterogeneous and present only in trace amounts (Fries et al., 2013).



**Table 1:** List of plastic additives studied with pyrolysis-GC/MS

Compound	Abbreviation/ Other Names	PubChem CID	Polymer studied <sup>a; b</sup>	Ref. <sup>c</sup>
<b>Plasticizers</b>				
Diethyl phthalate	DEP	7282	PE, PS, PP, PA HDPE, PP, PS PVA	[1] [3]* [31]* [32]
Dimethyl phthalate	DMP	8554	PET, PVC, PE, PS, PA HDPE, PP, PS	[4] [31]*
Di(2-ethylhexyl)phthalate	DEHP	8343	PE, PS, PP, PA n.a PE PET, PVC, PE, PS, PA ABS PE, PVC PVC PS, PVC, ABS, modified PS, cellulose propionate PE, PS, PP, PVC PET, ABS, PVC, PS HDPE, PP, PS	[1] [2]* [3]* [4] [5] [6]* [7]* [8]* [9] [10] [11]* [12]* [31]*
Butyl benzyl phthalate	BBP	2347	PE, PVC PVC PET, ABS, PVC, PS HDPE, PP, PS	[6]* [2]* [9] [7]* [8]* [12]* [31]*
Diisobutyl phthalate	DIBP	6782	PE, PS, PP, PA n.a PE PET, ABS, PVC, PS PVA	[1] [2]* [3]* [12]* [32]
Di-n-butyl phthalate	DBP	3026	PE, PS, PP, PA n.a PE PET, PVC, PE, PS, PA PET, ABS, PVC, PS HDPE, PP, PS PVA	[1] [2]* [3]* [4] [12]* [31]* [32]
Di(n-octyl) phthalate	DNOP	8346	PVC, PE PVC	[2]* [7]* [8]* [9]
Di-isononyl phthalate	DINP	590836	PVC, PE PVC HDPE, PP, PS	[2]* [7]* [8]* [9] [31]*
Di-isodecyl phthalate	DIDP	33599	PVC, PE PVC HDPE, PP, PS	[2]* [7]* [8]* [9] [31]*
Hexahydrophthalate de diisononyle	DINCH	11524680	PVC	[8]* [9]
Di-octyl adipate	DOA	31271	PVC PS, PVC, ABS, modified PS, cellulose propionate	[8]* [10]
Acetyl Tributylcitrate	ATBC	6505	PS, PVC, ABS, modified PS, cellulose propionate	[10]
Nonylphenols and nonylphenols ethoxylates	NPs and NPEs	-	ABS	[1] [5] [29]
benzaldehyde	-	-	PE, PS, PP, PA	[1]
Triphenyl phosphate	TPP	8289	PE	[10]

Table 1 (continued)

Compound	Abbreviation/ Other Names	PubChem CID	Polymer studied <sup>a, b</sup>	Ref. <sup>c</sup>
<b>Flames retardants</b>				
Octabromobiphenyl	-	3032840	n.a	[9]
Octabromodipheyl ether	-	6537506	n.a	[9]
Decabromodiphenyl oxide	-	14410	n.a	[9]
gama-Hexabromocyclododecane	$\gamma$ -HBCD	11377211	n.a	[11]*
Poly bromo diphenyl ethers	PBDEs	-	PE, PS, PP, PVC	[11]*
			PET, ABS, PVC, PS	[12]*
			PS	[13] [14]
tris(2-chloroethyl)phosphate	TCEP	8295	PET, ABS, PVC, PS	[12]*
short chain chlorinated paraffins	SCCPs	-	PET, ABS, PVC, PS	[12]*
Tetrabromobisphenol A	TBBPA	6618	PVC, epoxy coated material	[9] [15]*
			PET, ABS, PVC, PS	[12]*
Flames retardants	-	-	PVC, PC, ABS	[16]
<b>Antioxidants</b>				
Pentaerythritol tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate)	Irganox 1010	64819	PP, PBT	[17]
			gum base (blend of polymers)	[18]
			PE	[19]
			PE, PBT	[22]
Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate	Irganox 1076	16386	PE	[19]
			PP, LDPE	[20]*
			PE, PBT	[22]
2-(1,1-dimethylethyl)-6-3-(1,1-dimethylethyl)-2-hydroxy-5- methylphenylmethyl-4-methylphenyl acrylate	Irganox 3052FF	109058	PP	[21]*
1,3,5-tris[(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)methyl]-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione	Irganox 3114	93115	PP	[21]*
			PE, PBT	[22]
3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxybenzenepropanoic acid thiodi-2,1-ethanediyl ester	Irganox 1035	64883	PE, PBT	[22]
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite	Irgafos 168 = Alkanox 240	91601	PE, PP	[23]*
			gum base (blend of polymers)	[18]
1,2-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamoyl)hydrazine	Irganox MD1024	61916	PE, PBT	[22]
Hexamethylene bis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]	Irganox 259	64870	PE, PBT	[22]
Calcium bis(ethyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylphosphonate)	Irganox 1425	103255	PE, PBT	[22]
2-(2'-hydroxy-3',5'-di-t-butylphenyl)benzotriazole	Tinuvin 320	77455	polyamide-6 PP	[24]* [21]*
bis(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl) 2-butyl-2-[(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)methyl]propanedioate	Tinuvin 144	93348	PP, LDPE	[20]*
Tinuvin 571	Tinuvin 571	135332164	PP	[21]*
4-[2-(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)ethoxy]-4-oxobutanoic acid	Tinuvin 622	54328974	gum base (blend of polymers)	[18]
			PP, LDPE	[20]*
			PP	[25]
bis(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl) decanedioate	Tinuvin 770	164282	PP, LDPE	[20]*
2,2,4,4-tetramethyl-7-oxa-3,20-diazadispiro[5.1.118.26]heneicosan-21-one	Hostavin N20	631596	PP, LDPE	[20]*
			PP	[21]*
7-Oxa-3,20-Diazadispiro[5.1.11.2]Heneicosan-21-One,2,2,4,4-Tetramethyl-, Hydrochloride	Hostavin N30	348885796	PP	[21]*
2-[3,3-bis(3-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)butanoyloxy]ethyl 3,3-bis(3-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)butanoate	Hostanox O3	122891	PP	[21]*
N,N-dioctadecylhydroxylamine	Irgastab FS 042	3507778	gum base (blend of polymers)	[18]
Butylated hydroxytoluene	BHT	31404	ABS	[5]
			gum base (blend of polymers) butadiene/styrene copolymer	[18] [28]

Table 1 (continued)

Compound	Abbreviation/ Other Names	PubChem CID	Polymer studied <sup>a, b</sup>	Ref. <sup>c</sup>
<b>Antioxidants (continued)</b>				
4-tert-butyltoluene	TBT	7390	ABS	[5]
4-tert-octylphenol	4-t-OP	8814	ABS	[5]
2,4-Di-tert-butylphenol	-	7311	PE, PS, PP, PA	[1] [4]
2,6-di-tert-butyl-p-cresol	-	31404	ABS	[26]
propyl benzene	-	7668	ABS	[5]
1,3,5-trimethylbenzene	-	7947	ABS	[5]
N,N'-bis(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)hexane-1,6-diamine;2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine;2,4,4-trimethylpentan-2-amine	Chimassorb 944	83418	PP, LDPE; n.a	[20]* [24]*
<b>Monomer or intermediate</b>				
Bisphenol A	BPA	6623	n.a	[16] [27]*
Bisphenol S	BPS	6626	n.a	[27]*
<b>Other</b>				
N-methyl-2-pyrrolidone	NMP	13387	PS, PMMA, PVC	[33]

<sup>a</sup> PE: Polyethylene, LDPE: Low density polyethylene, PS: polystyrene, PP polypropylene, PC: polycarbonate; PVC: polyvinyl chloride, PVA: polyvinyl acetate, PA: Polyacrylamide, ABS: Acrylonitrile butadiene styrene, PET: Polyethylene terephthalate, PBT: poly(butylene terephthalate)

<sup>b</sup> n.a: not available

<sup>c</sup> absence of sign = qualitative study; \* = semi-quantitative study

[1]: Fries et al. (2013) ; [2]\*: IEC (2017) ; [3]\*: Kudo et al. (2019); [4]: Dekiff et al. (2014); [5]: Herrera et al. (2003) ; [6]\*: Kim et al. (2016) ; [7]\*: Maruyama et al. (2015); [8]\*: Randle et al. (2013); [9] Riess et al. (2000); [10]: Wang (2000c) ; [11]\*: Yanagisawa et al. (2018) ; [12]\*: Yanagisawa et al. (2019) ; [13]: Hosaka et al. (2005) ; [14]: Yuzawa et al. (2008) ; [15]\*: Rial-Otero et al. (2009) ; [16]: Wang (2000a) ; [17]: Manabe et al. (1999) ; [18]: Jansson et al. (2007) ; [19]: FrontierLab - Tech note - Irganox ; [20]\*: Perlstein and Orme (1985) ; [21]\*: Meyer-Dulheuer et al., 1998 (seen in Bart., 2001) ; [22]: Wang (2000b) ; [23]\*: Hermabessiere et al. (2020) ; [24]\*: Kuch., 1999 - unpublished results ; [25]: Roberson and Patonay (1990) ; [26]\*: Lichtenstein et al., 1986 (seen in Bart., 2001) ; [27]\*: Becerra and Odermatt (2012) ; [28]: Lichtenstein and Quellmalz (1983); [29]: Sitholé et Pimentel (2009) ; [30]: Kleine-Benne and rose (2011) ; [31]\*: La Nasa et al., 2021 ; [32]: La Nasa et al., 2019 ; [33]: Kim et al. 2017

## 2.2. Py-GC/MS for the quantitative analysis of plastic additives

The quantitative analysis of OPAs, with an initial thermal desorption (TD) step, is one of a wide diversity of applications of Py-GC/MS (Bart, 2001). More and more studies are showing interest for this application (Net et al., 2015). However, relatively few studies have managed to attain suitable quantification or semi-quantification of additives in polymers, with lacking information on the limits of detection or accuracy of the method for some studies (Table 2) and only on specific families of additives, mostly involving plasticizers especially phthalates (Fries et al., 2013; Kim et al., 2016; Kudo et al., 2019; La Nasa et al., 2021; Maruyama et al., 2015; Net et al., 2015; Yanagisawa et al., 2019) and BFRs (Rial-Otero et al., 2009; Yanagisawa et al., 2018).

The difficulty in acquiring quantitative data is a major drawback of pyrolysis. In the studies reporting Py-GC/MS quantitative determination of additives in polymeric matrices, a confounding factor is identified: the matrix effects on pyrolysis. It has been shown that the polymeric matrix can have an

effect on the thermal desorption and thus on the identification of the additive.

This is one of the major issues for semi-quantitative analysis using Py-GC/MS, which is not considered as a routine analysis because this method requires (i) calibration standards with the same polymeric matrix as the sample; (ii) time-consuming multiple measurements; and (iii) taking into account divergent standard procedures (Bart, 2001). These limitations are discussed below.

To ensure the same pyrolysis efficiency and linearity of the signal intensity for a range of concentrations, calibration must be carried out using different concentrations of additive standards (Bart, 2001). With Py-GC/MS, quantitative additive analysis can be performed either with an external calibration (EC) method or with an internal calibration (IC) method, which is often preferable (Bart, 2001; Odermatt et al., 2003).

Across studies, various techniques have been used to establish standard samples for the calibration curves and they will be presented in Section 3.1.3. Regardless of the method employed, multi-shot Py-GC/MS shows good results and linearity for calibration with coefficients of

determination ( $R^2$ ) of  $> 0.98$  and reported relative standard deviation (RSD) values of between 5% and 20% for most analyses (Table 2). The two available recovery rates reported for the verification of quantification using reference material (RMs) are satisfactory: greater than 70% in Yanagisawa et al. (2019) and 98.8–106.6% in Kim et al. (2017).

The accuracy of multi-shot pyrolysis must be compared with that of other extraction techniques (*e.g.* SE). In their study, Kim et al. (2017) found that, for equivalent RSD values (*i.e.*  $<5\%$ ) between pyrolysis and SE techniques, wet chemical methods result in a lower extraction efficiency and recovery rates that can be attributed to losses during sample preparation. Other studies have shown that multi-shot Py-GC/MS performs better than SE analysis for the identification of phthalates (IEC, 2017; Kim et al., 2016; Randle et al., 2013). The International Electrotechnical Commission (IEC, 2017) study considered this technique suitable for the screening and the semi-quantitative analysis of seven phthalates: DIBP, DBP, (BBP), DEHP, di(n-octyl) phthalate (DNOP) (PubChem CID: 8346), di-isononyl phthalate (DINP) (PubChem CID: 590836), and di-isodecyl phthalate (DIDP) (PubChem CID: 33599) in polymers that are used in electro technical products in the range of 100 to 2000 mg/kg. In contrast, the SE technique followed by LC/MS analysis has shown limitations for the determination of phthalates: only five phthalates (BBP, DEHP, DNOP, DINP, and DIDP) were identified, due to low peak and spectral resolution quality. Several studies report equivalent and satisfactory results with multi-shot Py-GC/MS and with SE-GC/MS methods, regarding recovery and repeatability rates. For example, SE analysis of phthalates from different studies showed good recovery rates (97.6 to 104% (J.W.Kim et al., 2016; IEC et al., 2017)) and repeatability rates (%RSD), from 9 to 15% in the study of J.W.Kim et al (2016), 5.4% in the study of Kim et al (2017) and between 0.29 and 1.24% in the study of IEC (2017). In comparison, Py-GC/MS studies showed similar values with recovery rates of over 98% (La Nasa et al., 2021) and between 78 and 117% (J.W.Kim et al., 2016; Yanagisawa et al., 2019; Kudo et al., 2019) and high repeatabilities of 5% and 10% (Yanagisawa et al., 2018 and 2019 respectively) and between 7.7 to 20% (J.W.Kim et al., 2016). In this latter study, the high reproducibility of the Py-GC/MS method was also confirmed by six other international laboratories, and recommended by the IEC Technical Committee (TC) 111 Working Group 3 (WG3), which conducted the same studies. For TD followed by pyrolysis, the quantification recoveries were between 78.3–117.4% (Kim et al., 2016) and between 92–103%, for inter-lab studies (Kim et al., 2016). Finally, the comparison of studies for the quantification of plastic additives performed using either pyrolysis or SE methods showed comparable

results, with most of the time a recovery rate for Py-GC/MS slightly lower than SE techniques (approximately 10% lower).

It is important to define precisely the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ), considering the low concentrations of additives in environmental sample, ranging from sub ng/g to  $\mu\text{g/g}$  levels (Emma L Teuten et al., 2009), and of certain additives in polymeric matrix samples. The LOD and LOQ values of SE analysis are lower than pyrolysis values, indeed, solvent extraction has a pre-concentration step that makes it possible to reach lower LODs. In addition, regarding the LOD and LOQ values in the literature for pyrolysis analysis (Table 2), quantification can be complicated, especially because the amount of sample analysed in the pyrolyser is low too. Therefore, Py-GC/MS can usually only be considered as a semi-quantitative method. The quantitative potential of this technique still requires considerable development and control. This need for optimization certainly limits the acceptance of this technique for routine quantification in the industrial sector. Also, understanding and being aware of the artefacts generated during pyrolysis of environmental samples, which are complex samples, is crucial for reliable analysis (Terán et al., 2009). Thus, various preliminary experiments with clean matrix samples and pure standard mixtures must be performed.

**Table 2:** Data about quantitative analysis of organic plastic additives with multi-shot Py-GC/MS

Compounds <sup>a</sup>	Type of analysis	Method	Matrices	RSD (%)	R <sup>2</sup>	Recovery (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Concentration ranges (mg/kg)	Ref.
<b>Phthalates</b>										
DIBP, DBP, BBP, DEHP	recovery test	in house RMs solution	PS, ABS, PET, PVC	10	n.a	> 70	n.a	n.a	100 – 1000	[1]
Phthalates	Semi-quant	RMs	PE	< 15	n.a	79 - 113	n.a	n.a	110 – 110x10 <sup>3</sup>	[2]
DEHP	Calibration	pyolysis cup spiking	PP, PVC, PS	5	>0.98	n.a	14 - 46	n.a	0 – 2000	[3]
DIBP, DBP, BBP, DEHP, DNOP, DINP, DIDP	Calibration	RMs	n.a	< 9	0.99	n.a	< 28	n.a	80 – 965	[4]
	Semi-quant	indirect method	n.a	< 7.4 < 20	0.99	78 - 117.4 92 - 103	n.a	n.a	2.03 – 957	[4]
Phthalates	Calibration	RMs	PVC	n.a	n.a	n.a	< 100	n.a	n.a	[5]
	Semi-quant	indirect method	PVC	n.a	n.a	n.a	12.0 - 17	n.a	n.a	[5]
DMP, DBP, BBP, DEHP, DINP and DIDP	Calibration	pyrolysis cup spiking	n.a	n.a	0.99	96 – 100%	< 1	< 3.5	0.003 – 3.67	[6]
<b>Flames retardants</b>										
TBBPA	recovery test	in house RMs solution	PS, ABS, PET, PVC	10	n.a	> 70	n.a	n.a	100 – 1000	[1]
TCEP, decaBDE	recovery test	in house RMs solution	PS, ABS, PET, PVC	10	n.a	> 70	n.a	n.a	100 – 1000	[1]
BFRs, SCCPS	Calibration	pyolysis cup spiking w/ stock solution	PP, PVC, PS	5	>0.98	n.a	14 - 46	n.a	0 – 2000	[3]
TBBPA	Semi-quant	Direct method	epoxy coates	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	[7]
<b>Antioxidants</b>										
Tinuvin 622 Chimasorb	Calibration	SE step prior to pyrolysis	PP	n.a	n.a	86 - 99.4	< 50	n.a	210 – 8790 46 – 7947	[8]
<b>Monomer or intermediates</b>										
BPA	Calibration	in-house solid RMs	paper	4; 19; 56	0.99	n.a	0.35 - 0.61	0.99 - 1.83	0 – 100	[9]
BPS	Calibration	in-house solid RMs	paper	2.6 ; 4.4	0.99	n.a	0.4 - 0.97	1.29 - 1.56	0 – 100	[9]
<b>Other</b>										
solvent (NMP)	Calibration	precoated sample cups spiked with stock solution	PS, PMMA, PVC	< 5.3	0.99	n.a	0.016	0.05	0.1 – 1	[10]
solvent (NMP)	recovery test	in-house solid RMs in precoated sample cup	PS, PMMA, PVC	< 5	0.99	98.8 - 106.6	n.a	n.a	600	[10]
<sup>a</sup> NMP = N-Methyl-2-pyrrolidone n.a: not available [1]: Yanagisawa et al. (2019) ; [2]: Kudo et al. (2019) ; [3]: Yanagisawa et al. (2018) ; [4]: Kim et al. (2016) ; [5]: Maruyama et al. (2015) ; [6]: La Nasa et al., 2021 ; [7]: Rial-Otero et al. (2009) ; [8]: Roberson and Patonay (1990) ; [9]: Becerra and Odermatt (2012) ; [10]: Kim et al. (2017)										

### 2.3. Parameters influencing the analysis of plastic additives

The key to a successful analysis of plastic additives is to understand and have expertise on the properties of commercial additives, polymers and their applications, as well as the Py-GC/MS technique (Wang, 2000c). Several points are crucial for the correct identification of an additive. The detection of additives in polymers using Py-GC/MS can be influenced by (i) the fragmentation behaviour of the analytes — the degree of fragmentation depends on the temperature — ; (ii) the concentration; and (iii) the structure of the additive and polymer fragments (Bart, 2001).

Depending on the pyrolyser type, Py-GC/MS possesses a vast number of different instrumental configurations: Py-GC interface; presence of a cooled injection system (CIS); gas chromatographic characteristics such as column type, carrier flow rate, etc.; mass spectrometer characteristics including ionization mode; and operational variables such as pyrolysis temperatures, pyrolysis duration, vapor pressure, etc. Moreover, the composition of the pyrolysis products depends on specific conditions including temperature, duration, sample size, carrier gas flow rate, all of which make standardization difficult.

Py-GC/MS can be applied to analyse thermally labile and volatile additives, which result in extensive fragmentation. Derivatization can extend the applicability of the technique to certain molecules (Bart, 2001) (see Section 3.1.4.). If there is no derivatization treatment and the compounds cannot be extracted, flash pyrolysis of both the additive and the polymer must occur simultaneously. The SIM mode of MS detectors is an interesting approach and seems to be most informative, because it drastically simplifies the mass spectra and the identification process (Jansson et al., 2007). In addition, electron ionization (EI) allows the identification of the compounds considered too heavy to be identified using Py-GC/MS due to their high molecular weight (MW) which is above the limit of mass detection. Unlike soft ionization techniques, *e.g.* chemical ionization (CI), that allow conservation of more information on structure and molecular identity, EI at 70 eV causes extensive fragmentation (Bart, 2001). Thus, smaller characteristic fragments from the molecule are determined but not the exact MW of the

compound. Sometimes the isolation of specific additive fragments for the identification of individual compounds is difficult when analysing a complex matrix. However, SIM mode detection, with a preliminary selection of specific ions, may help to isolate and identify co-existing additives in a polymer.

### 2.4. Advantages and limitations of Py-GC/MS

In the various analytical pyrolysis studies that we reviewed, the same assets and drawbacks were generally observed; they are summarized in Table 3.

First, contrary to the more “traditional” wet-chemistry techniques, Py-GC/MS does not require pre-treatment of the sample and extraction steps, limiting background contamination (Académie des sciences, 2021; Dekiff et al., 2014; Fries et al., 2013; Kudo et al., 2019; Terán et al., 2009). The possibility of conducting a multi-shot analysis is clearly the major advantage of Py-GC/MS, allowing the co-identification of OPAs and plastic polymeric matrices (Derenne and Quénéa, 2015; Fries et al., 2013; Okoffo et al., 2020; Wang, 2000c). Multi-shot pyrolysis is a suitable technique for extracting OPAs embedded into the polymeric matrix at lower temperatures before determining the polymers (Fries et al., 2013; Okoffo et al., 2020). Moreover, other additives, such as organic pigments, can be characterized by Py-GC/MS (La Nasa et al., 2019). Indeed, with this analytical technique, organic pigments generally do not interfere with the identification of the binding medium (Bart, 2001), a problem that has been mentioned for Raman analysis, which is only able to analyse the surface of a microplastic (MP) particle (Hermabessiere et al., 2018).

However, depending on the chemical nature of the additive, certain OPAs can be complex to analyse and can be hard to mobilize (Riess et al., 2000; Yanagisawa et al., 2018). To detect these additives, there are two solutions for improving their volatility: (1) a derivatization step, usually involving the use of TMAH, which is toxic for the environment and human health, (2) higher pyrolysis temperatures (>500°C), with the inconvenience of having a complicated chromatogram with overlapping peaks from the additives and the degraded polymeric matrix, especially since it has been shown that the polymeric matrix can have affect the thermal desorption and, thus, the identification of the additive (Bart, 2001).

**Table 3:** Summary of the main advantages and drawbacks of analytical pyrolysis devices for plastic additives and polymer analysis.

Advantages	Drawbacks and limitations
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minimal and short sample preparation time</li> <li>• Wide application range – applicable to various polymers and various organic additives</li> <li>• Simultaneous identification and semi-quantitation of various additives in one experimental run without prior separation</li> <li>• Direct analysis of complex mixtures</li> <li>• Successive and rapid identification of plastic additive and plastic polymer, with multistep method</li> <li>• Analysis solid or liquid samples (solid polymers dissolved in an adequate solvent)</li> <li>• Small samples quantities (&lt;1mg) and sizes</li> <li>• Automation and short analysis time; rapid screening</li> <li>• High sensitivity (detection at a concentration &lt;50 mg OPA/kg of polymers). Trace analysis</li> <li>• High information content: Molecular structural information from the mass spectral fragmentation pattern and elemental compositions of mass signals from high resolution mass spectrometry</li> <li>• Fewer interferences between polymers and additives (such as pigments)</li> <li>• Automated solvent venting removes unwanted solvent prior to pyrolysis (it potentially eliminate manual sample preparation steps and permits the accurate analysis introduction of small amounts of polymer in solution)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destructive analysis</li> <li>• Lack of detection for polar, high molecular weight and low volatile products (without any prior sample treatment such as derivatization).</li> <li>• Quantitative analysis is not easy to perform.</li> <li>• Complex mixtures produce many pyrolysis products and fragments (electron-impact fragmentation), which makes a mass spectrum difficult to interpret</li> <li>• The TD of plastic additives is influenced by the geometrical surface of the particle =&gt; Sampling problems for heterogenic materials.</li> <li>• Difficult interlaboratory reproducibility of Py-GC/MS caused by various factors, including the materials and the different methods of pyrolysis and GC analysis.</li> <li>• Strict standardization is required of all experimental conditions.</li> </ul>

Py-GC/MS analysis is nonetheless rapid, precise and sensitive, and can be used on various types of sample *e.g.* liquid or solid. Moreover, this is a powerful method for characterizing the complete composition of a polymeric material using a minimum amount of sample (10-100µg) allowing sampling without damaging the studied sample (La Nasa et al., 2020). These features make Py-GC/MS one of the only characterization methods that can be used for small amounts of material, especially in light of the fact that certain additives are present in low concentration in polymeric matrices. Quantifying the amount of additives included in a polymeric matrix sample turns out to be complicated. Few studies have managed to attain an adequate quantification or semi-quantification of additives, and excessive LOD and LOQ values prevent Py-GC/MS from being used for quantitative applications (Emma L Teuten et al., 2009).

### 3. Analytical methods for the analysis of plastic additives using multi-shot Py-GC/MS

Py-GC/MS has been used to identify and sometimes semi-quantify plastic additives in polymeric matrices. In this section, we discuss the different steps involved in sample preparation before analysis and the importance of the various parameters in a Py-GC/MS method for adequate identification of the additives according to their chemical family.

#### 3.1. Sample preparation for the analysis of additives in plastics using pyrolysis

##### 3.1.1. Sample weight and sizes

Depending on the studies, the mass of analysed sample vary. Most often, the amounts of polymers analysed in studies on plastic additives and polymer determination using Py-GC/MS range from 100 to 200 µg (Randle et al., 2013) or from 500 to 1000 µg (Fries et al., 2013; IEC, 2017; Kim et al., 2016; Yanagisawa et al., 2018; Yanagisawa et al., 2019; Yuzawa et al., 2008). Despite the limit of saturation of the analytical

device, which depends on the targeted compound and the complexity of the matrix, there is no real minimum or maximum sample size limitation. The maximum size of plastic particles that can be analysed is determined by the diameter of the TD tubes (Fries et al., 2013) that vary from one device to another. Dekiff et al. (2014) estimated the minimum particle size required for pyrolysis at approximately 100  $\mu\text{m}$ , because smaller particles are difficult to handle. However, Hermabessiere et al. (2018) proposed a lower size limit of 50 $\mu\text{m}$  for the analysis of plastic using Py-GC/MS. Moreover, although pyrolysis is able to analyse a small amount of sample, the detection of the whole additive content may be difficult due to the low proportion of certain additives in plastics.

Therefore, most of the time, a relatively large quantity of sample is required to identify the additives and detect a signal. In the study of Riess et al. (2000), the best results were obtained by pyrolysing  $1.8 \pm 0.1$  mg of a sample in triplicate to test the reproducibility of the results. The RSD for the peak areas of the flame-retardants were between 2.1% for tribromobisphenol A and 20.6% for tetrabromobisphenol A (TBBPA). Even though a high RSD value of 20% is tolerated, this higher value was attributed to potential heterogeneities in the sample, due to small variations in the size or shape of the polymer. As mentioned above, this is one of the limitations in pyrolysis experiments (cf. Section 2.4.) where the thermal desorption of plastic additives is influenced by the sample geometry (Bart, 2001).

### 3.1.2. Sample introduction methods

Prior the introduction into the pyrolysis device, the sample is cut, crushed and/or (cryo)-grind to improve its homogeneity. Then, the desired amount of sample is weighted using an analytical precision balance before analysis (Kim et al., 2016; Yuzawa et al., 2008). Two types of method have been distinguished in the literature and are described below:

- (i) A "direct method", which is the analysis of a solid plastic sample that is weighed and directly introduced into the pyrolyser to thermally extract additives from the polymer (IEC, 2017; Randle et al., 2013). An approximate amount of deactivated quartz wool can be placed above the sample to avoid any loss of the sample. The sample can also be placed between two pieces of quartz wool to reduce the amount of material leaving the sampling tube during pyrolysis (Kudo et al., 2019; Tsuge et al., 2011).
- (ii) An "indirect method", which consists in analysing a dissolved sample. A certain amount of an appropriate solvent is added to the

ground polymeric sample. After complete dissolution of the powder, a known volume, 10 or 20  $\mu\text{L}$ , of the sample solution is added to a sample cup (Randle et al., 2013). However, the use of a solvent can add interference and cause contamination.

Randle et al. (2013) compared the analytical efficiency and precision of these two methods. One of the advantages of the "indirect" method is the homogeneity of the aliquot, whereas the "direct" method is a random sampling of particles, which can cause sample-to-sample reproducibility problems. Considering that most additives are not chemically bound to the polymer, the concentration of additives may not be homogeneously distributed in the polymer matrix, resulting in potential high variability in additive concentration across matrices, *e.g.* the study on Irgafos® 168 analysis (Hermabessiere et al., 2020). Thus, the measurement accuracy depends on multiple factors: the homogeneity of the sample and the precision of the equipment (*e.g.* analytical balance, syringe) used to transfer the sample into the pyrolysis cups. Therefore, the analysis of a weighed amount of sample will not affect identification efficiency, but can cause some bias in precision, especially for quantification purposes (Riess et al., 2000).

### 3.1.3. Calibration curves

To ensure efficient pyrolysis for quantification purposes, calibration must be carried out with different concentrations of additive standards (Bart, 2001). According to various studies, several techniques have been employed to establish standard samples for the calibration curves in Py-GC/MS. They are presented below, by growing levels of implementation difficulty:

- The "Pyrolysis cup spiking": the direct analysis of different concentrations of a liquid solution of additive standards directly injected in a pyrolysis sample cup. This method was used in two studies of Yanagisawa et al., (2018; 2019) as the first step to develop a Py-GC/MS method. A standard solution mix containing all the targeted compounds (five phthalates and five flame retardants) was prepared at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in toluene and 5.0  $\mu\text{L}$  of this standard solution was directly injected into a pyrolysis sample cup for the Py-GC/MS analysis. Then, different concentration levels (0, 250, 500, 750 and 1000 mg/kg) were prepared and analysed using this Py-GC/MS method. The obtained calibration curve was quite satisfactory, with an  $R^2$  value greater than 0.996.

- The "Quartz-wool spiking": introduction of some additive-free and inert quartz wool into the pyrolysis cup and spiking the wool with a liquid solution of additive standards. In an attempt to obtain a calibration curve using pyrolysis, some studies have



spiked a 3mm diameter piece of quartz wool, pre-cleaned with hexane, with the additive(s) of interest or a mixture of a standard solution (Fries et al., 2013). The sample was then analysed using Py-GC/MS to extract and determine the standards spiked on the quartz wool.

The efficiency of these two techniques have not yet been compared in a single study; however, the presence of quartz wool likely increases the retention of the compounds to enhance their identification. These two methods do not include the polymeric matrix in the preparation of the samples for the calibration curves. If a few microliters of the standard solution is directly injected into a pyrolysis sample cup, the precision and the reproducibility for the additives may be poor, at least for the most volatile additive. Indeed, losses caused by evaporation can be significant, especially because they are spread out on the cup surface in a thin layer (Randle et al., 2013).

The application of a TD step with Py-GC/MS using these methods can be problematic for the accurate determination of some compounds. Semi-volatile compounds with high vapour pressure can evaporate during the sample preparation procedure and the waiting time before analysis (Hosaka et al., 2015; La Nasa et al., 2021). Hosaka et al. (2015) compared the TD analysis of a mixture of 10 phthalates in two conditions: immediate measurement after adding the phthalate stock solution to the pyrolysis sample cup, and the analysis of the solution after different waiting times (0, 50, 100, 150 and 200 min) at 25°C. As expected, peak areas of the most volatile phthalates (DMP and DEP) significantly decreased with increasing waiting time, to reach a reduction of 90 and 50%, respectively, at 200 min. On the other hand, the abundance of the eight other phthalates, less volatile with a lower vapour pressure, did not show any decrease. These results indicate that, using conventional sample cup spiking, it can be difficult to obtain a satisfactory calibration curve for the quantitative analysis of the most volatile compounds with high vapour pressure, due to their evaporation prior to analysis during the waiting time. Spiking the solution of additives on a polymeric matrix, using a pre-coated sample cup, *i.e.* coated with a thin layer of polymer, or polymeric certified reference materials (CRMs), can help prevent this evaporation.

Hosaka et al. (2015) was the first to use a pre-coated sample cup, in which a few microliters of the additive standards was added to the pyrolysis cup. The coating acts as a sorbent for the most volatile compounds and likely suppresses or at least reduces their rapid volatilization from the sample cup, especially for quantitative analysis (Hosaka et al., 2015; Kim et al., 2017). This reduction of emission was explained by the potential rapid diffusion of the additive mixture into the coated polymer film. In these two studies, the inner surface of a deactivated stainless steel cup was coated with a thin layer of PVC

(10 to 20  $\mu\text{m}$  with 0.5 and 1 mg of the polymer). In Hosaka et al. (2015) study, the results showed that the peak intensity for all the phthalates, even the one with high vapour pressure, are comparable for waiting times of 0 and 200 min. This result suggests that using a PVC-coated sample pyrolysis cup is an efficient way to reduce the volatilization of compounds. Moreover, this technique shows a great reproducibility with RSD values lower than 3%. Hosaka et al. (2015) also tested PS and poly(methyl methacrylate) (PMMA) as polymer coating that also showed great results in reducing the emission of semi-volatile phthalates. However, when heating polymers at high temperatures, in this case around 320°C, degradation products of the polymers may interfere with the measurement of the additives studied. Naphthalene, biphenyl and hydrogen chloride appeared in the chromatogram of PVC coated sample cup, styrene dimers and trimers peaks appeared in the PS coated cup and MMA dimers and trimers appeared in the PMMA coated sample cup. However, those peaks did not affect the analytical results because they were well separated from the additives peaks and the degradation product of PVC showed shorter retention times. Nonetheless, PVC is known to contain large amount of plasticizers, thus, people have to be careful of the amount of additives already included in the polymers, or, guarantee that the polymers used are additive free.

In addition to limiting the volatilization of additive compounds, adding the additive standards on the matrix also allows to be more representative of what happens during the thermal desorption process. Indeed, some interactions can occur between the different additives and the matrix there are included in. Including a "matrix effect" in the calibration process can help consider these potential interactions as well as the impact of the extraction procedure on the compounds. Bart (2001) advised the use of a mixture of polymers and additives, to compensate for the variations and normalize the signal. As explained in the review of Cuadros-Rodríguez et al. (2007), the matrix effect can be controlled by the "matrix-matched calibration" (MC) technique using a matrix CRM. Matrix CRMs contain different known concentrations of the analytes of interest and the compounds characterizing the polymeric matrix (Cuadros-Rodríguez et al., 2007; Kim et al., 2016; Maruyama et al., 2015). CRMs are recommended for calibration and sensitivity assessment of the instrument to ensure efficient analysis (Maruyama et al., 2015). RMs are also useful for comparing and verifying the recovery efficiency of the analytical method. Indeed, considering that an additive may react with degradation products or other additives present in the tested polymer, the quantitative method must also be verified before it can be accepted as a suitable approach and applied to unknown or environmental samples. Finding appropriate test

samples is crucial for this verification procedure. Nonetheless, appropriate test samples are difficult to find. In addition, not all reference standards are commercially available for all polymers or plastic additives, nor for the simultaneous determination of multiple additives (Derenne and Quénéa, 2015). A few studies have mentioned this problem and propose using in-house RMs to overcome this issue. These RMs can be prepared in the laboratory as alternatives to CRMs by adding a pure or a mixed standard solution of additives to an additive-free polymeric matrix (Cuadros-Rodríguez et al., 2007; Kim et al., 2017) or polymer solution (Yanagisawa et al., 2019). They are called "in-house RMs". Two types of in-house RM approach have been differentiated:

(i) Spiking a virgin solid polymeric matrix with an additive standard solution (Randle et al., 2013). For this purpose, a weighed amount of additive-free polymer samples is placed in a pyrolysis sample cup and mixed with a known volume of the additive stock solution (Becerra and Odermatt, 2012; Odermatt et al., 2003). For example, Kim et al. (2017) added 0.1% of additives (according to the regulated concentration).

(ii) Spiking a polymeric solution with an additive standard solution (IEC, 2017; Yanagisawa et al., 2019). To assure a homogeneous sample, the polymer particles are weighed and dissolved completely in an appropriate solvent to prevent precipitation. Then, a given volume, from 10 to 20  $\mu\text{L}$ , of a known concentration (50 mg/mL) of the polymer solution and a few  $\mu\text{L}$  (ca. 5  $\mu\text{L}$ ) of a known concentration of additive standard mixture solution (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) are injected in a pyrolysis sample cup. This mixed solution is dried at room temperature in the sample cup before the TD analysis. Although this method allow a better homogeneity of the sample, using a solvent may introduce biases (*i.e.* contamination, toxicity for the technician, interference with the targeted molecule(s)) and some polymers are difficult to solubilise.

These matrix-matched calibrations requires a matrix free of target analyte(s). This is not always possible in the case of plastic polymers, as a matter of fact, some additives, *e.g.* BFRs such as TBBPA, are chemically bound to the polymer. For this reason, it is necessary to use the standard addition method. Standard addition allows quantifying the amount of analyte in any kind of sample, because this is the only method in which the results will not be affected by matrix effects (Cuadros-Rodríguez et al., 2007; IEC, 2017). However, this approach requires a lot of routine work analysis since a separate calibration must be made for each sample and each specific polymeric matrix. Standard addition can also integrate the interferences due to system contamination or to the matrix complexity.

#### 3.1.4. Derivatization approach

Several drawbacks are associated with Py-GC/MS including the fact that certain compounds are difficult to analyse with Py-GC/MS. Only pyrolysis products that are GC-operable can be detected. Consequently, the pyrolysis compounds of the most polar or heavy MW products often show peak tailing, long elution times, poor reproducibility, or, in some cases, absence of peaks (Challinor, 1989; Derenne and Quénéa, 2015). The limitation of this analytical chromatographic system can be overcome with a derivatization step. The purpose of this derivatization reaction is to modify the sample to produce a more volatile derivate. It will enable to enhance chromatographic separation and detection results for the compounds that are not suitable for efficient detection, and will also improve the pyrolysis process for qualitative and quantitative analysis (González-Vila et al., 2001; Rial-Otero et al., 2009; Venema and Boom-Van Geest, 1995).

Applying derivatization during pyrolysis provides very beneficial and complementary information. The pyro-derivatization-GC/MS technique can be used to facilitate the detection and identification of small quantities of polar components of polymers and plastic additives. Derivatization allows the conversion of non-volatile or thermally sensitive compounds into relatively more volatile derivatives. The same technique has been adapted and is well established for polymer and additive analysis using Py-GC/MS, extending its capabilities by modifying the TD approach or enhancing the detectability of the molecules (Sobeih et al., 2008).

Challinor (1989) reported the first combined pyrolysis/derivatization of phenolic resins and polyester polymers, and polymer additives, with the addition of a derivative agent: tetramethylammonium hydroxide (TMAH). Different methods of derivatization have been reported such as hydrogenation, silylation, butylation, alkylation and methylation with addition of different derivative agents (Derenne and Quénéa, 2015; Rial-Otero et al., 2009; Sobeih et al., 2008). Methylation is the most common derivatization reaction which is mainly performed with TMAH (Académie des sciences, 2021; Becerra and Odermatt, 2012; Derenne and Quénéa, 2015; Jeknavorian et al., 1998; Manabe et al., 1999; Rial-Otero et al., 2009; Venema and Boom-Van Geest, 1995). However, this reagent needs to be handle with special care due to its potential hazard for the laboratory technician. In addition to its toxicity for the environment, TMAH is categorized as corrosive for the skin and eyes, and toxic for humans.

Derivatization is a simple procedure that consists in adding an excess of the derivatization agent to the sample pyrolysis cups, containing the sample, and to the calibration solution. The rationale behind this procedure lies in the fact that, when the analysis includes a derivatization step, the internal standard

should also react in the same way as the analyte (Becerra and Odermatt, 2012). The derivatization process is time-consuming, and adding an exogenous solution runs the risk of adding other additives or impurities to the sample, emphasizing the importance of carrying out controls and blanks, but, in some situations, shows more sensitivity than the conventional technique (Challinor, 1989; Frederiksen et al., 2007). Derivatization has been applied in several studies to improve the analysis of some plastic additives using Py-GC/MS such as some anti-oxidants, *e.g.* Irganox® 1010 and 1076, Bisphenol A (BPA), Bisphenol S (BPS) (Becerra and Odermatt, 2012; FrontierLab; Manabe et al., 1999) and flame retardants such as PBDEs and TBBPA (Chokwe et al., 2017; Frederiksen et al., 2007). More recently, Fischer and Scholz-Bottcher (2017), demonstrated that thermochemolysis is an excellent analytical tool for identifying and quantifying MPs and their associated additives in environmental samples, at trace levels.

In several studies, some parameters influencing *in situ* methylation with TMAH during pyrolysis have been investigated. Both pyrolysis temperature and amount or concentration of the derivatizing agent, as well as pH value, can affect the chemical nature of the formed products.

The amount of TMAH determines the degree of methylation. After the addition of TMAH in excess, the pH can be adjusted by adding acetic acid for example. However, Venema and Boom-Van Geest (1995) demonstrated that pyrolysis temperature has a less pronounced effect than pH on derivatization efficiency. The role of the solvent is also subject to debate (Challinor, 2001; Venema and Boom-Van Geest, 1995). In general, the solvent of the derivatizing agents, *i.e.* methanol or water, does not affect the derivatization process and efficiency because the solvent added to the analyte is evaporated slowly before the introduction of the sample into the pyrolysis device. However, in the case of polycondensation polymers, such as polyamides (PA) or poly(ethylene terephthalate) (PET), the solvent effect is significant and strongly influences the methylation of the compounds, affecting the chemical nature of the product formed and, consequently, the pattern of the pyrogram. The use of water as a solvent for TMAH increases hydrolysis degradation mechanisms and creates different by-products, such as tetramethyl ammonium salt, which have to be pyrolysed at high inlet temperatures to form the corresponding methyl esters. However, in the case of methanol, TMAH behaves like a transesterification catalyst, resulting in the direct formation of methyl esters, even if the hydrolysis reaction is expected to be the most likely mechanism (Venema and Boom-Van Geest, 1995). Pyrolysis temperature may influence the success of the pyrolysis-derivatization process. Venema and Boom-Van Geest (1995) reported that there are more impurities, originating

from the derivatizing reagent, *i.e.* TMAH, at temperatures above 500°C. The thermochemolysis process is very sensitive to the matrix effects of the studied polymer. Due to the complex chemistry related to different functional groups, and to the diverse parameters influencing detection and separation, the observed data need to be interpreted very carefully (Venema and Boom-Van Geest, 1995).

### 3.2. Multi-shot Py-GC/MS methods for the analysis of OPAs

Several pyrolysis methods have been developed for the identification and quantification of OPAs contained in a polymeric matrix (Table 4). In the various studies on the analysis of plastic additives, two different approaches have been used. However, there is no established standard protocol to identify and quantify these compounds.

The majority of the first methods for the analysis of plastic additives were developed at high pyrolysis temperatures on different types of additives: antioxidants and light stabilizers at 770°C and 800°C respectively (Perlstein and Orme, 1985; Roberson and Patonay, 1990), BFRs at 950°C (Wang, 2000a), nonylphenols (NPs) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) at 650°C (Sitholé and Pimentel, 2009). In these cases, the additives were identified by analysing the characteristic fragments that were produced during flash pyrolysis. Unfortunately, although these methods can successfully identify the targeted molecules in polymeric matrices, fragmentation at such high temperatures produces too many peaks for an easy and efficient detection in full scan detection mode. The polymer matrix is also broken down into monomers, oligomers, and other fragments. Thus, without preliminary work on finding indicator and specific ion(s) for the targeted molecule, it may be difficult to distinguish between fragments coming from the polymers or from the additive. Moreover, most of these studies did not directly analyse the sample, but included an SE step prior to pyrolysis.

These studies led to a second approach to identify plastic additives: multi-shot pyrolysis with a TD step during the first shot of pyrolysis. During this initial TD step, the polymer is heated at low temperatures (<500°C) to desorb the volatile compounds (*e.g.* OPAs) usually found in polymers, without degrading the plastics. Most of the time, a temperature around 300°C or 350°C is chosen (Table 4). Heating the sample at low temperatures helps avoiding the breakdown of the polymeric matrix, leading exclusively to the desorption of the additives, making identification easier. Indeed, the additives are usually detected at temperatures below the decomposition temperature of the polymer (Bart, 2001). The various studies using this thermal extraction method have observed that, at such temperatures, the polymers do not decompose and no polymer markers are detected in the chromatogram. Moreover, no measurable

effects have been reported on the accuracy of the further plastic identification and quantification (Okoffo et al., 2020). In their study of fast identification of polymer additives using Py-GC/MS, (Herrera et al., 2003), used SIM to monitor the appearance of certain ions of known  $m/z$ , such as  $m/z$  149 and 205, which are characteristic of phthalate ester plasticizers and the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) (PubChem CID: 31404). These two ions were found in the TD chromatogram after a heating at 300°C during the first thermal step, but not in the pyrogram after a heating at 500°C. This indicates that these ions arose from additives that were fully removed during the first step. Twenty years prior, the same observation was reported : a 1983 study (Lichtenstein and Quellmalz, 1983), on the analysis of the antioxidant BHT in butadiene/styrene copolymer using curie-point Py-GC/MS showed a better identification of the additive at a pyrolysis temperature of 300°C. At this temperature, the chromatogram revealed a unique peak with a high abundance, corresponding to BHT. In contrast, at 500°C the identification of the targeted molecule was complicated, abundance was low, and the peak was overshadowed with the multiple peaks of the polymer fragments. Furthermore, the complexity of pyrograms increases at higher pyrolysis temperatures (Terán et al., 2009).

Although this technique shows variable efficiency and some limitations, according to the type of additive studied, multi-shot Py-GC/MS has been used — and is used — more and more frequently for the identification and even the semi-quantification of plastic additives (ASTM-7823:14, 2014; Fries et al., 2013; Hashimoto et al., 2001; Hermabessiere et al., 2020; Herrera et al., 2003; IEC, 2017; Kang et al., 2005; Kim et al., 2016; La Nasa et al., 2021; Liu et al., 2008; Okoffo et al., 2020; Terán et al., 2009; Yuzawa et al., 2009). As mentioned above, several parameters can be modified according to the type of compounds that need to be analysed and the polymer sample (*e.g.* pyrolysis temperature, pyrolysis duration, ion source temperature, injection temperature, transfer line temperature, oven GC temperature, CIS, split ratio, carrier gas, acquisition mode (full scan (FS) or SIM)).

**Table 4:** Py-GC/MS method parameters for the analysis of plastic additives in various studies. Cf. Table 1 for the corresponding compounds analyzed.

Ref.	Pyrolysis T° (°C)	Pyrolysis time (sec)	Thermochemo analysis	GC-MS oven program	Ion source T° (°C)	Transfer line T° (°C)	Injection T° (°C)	Split	Scan Range (amu)	Vent flow (mL/min)	CIS	Column
[1]; [23]	350	60	-	40°C → 10°C/min → 350°C (10min)	n.a	350	n.a	splitless	10-600	60	-50	HP-5MS 30m x 250µm x 0.25µm
[2]	340	60	-	80°C → (20°C/min) → 300°C (5 min)	230	300	300	50	50 - 1000	1.5	non	Type of column: n.a 30m x 0.25 mm x 0.25µm
[3]	340	60	-	80°C → 20°C/min → 300°C (5min)	230	300	300	50	50 - 1000	52.1 cm/s	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05 µm
[5]	300	150	-	60°C → 5°C/min → 90°C (1,5min) → 10°C/min → 300°C (10min)	n.a	300	280	n.a	SIM	1.5	-196	UA5-30M-0.25F Frontier Lab 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm
[6]	340	60	-	40°C (1 min) → (50°C/min) → 200°C → (15°C/min) → 300°C (5 min)	230	300	300	50	50 - 500	1	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05µm
[7]	340	60	-	80°C → (20°C/min) → 300°C (5min)	230	n.a	320	50	50 - 500	52.1 cm/s	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05µm
[8]	320	n.a	-	(1) 80°C(1min)→ 50°C/min →200°C→15°C/min→ 350°C(2min) (2) 40°C → 40°C/min → 200°C →5°C/min → 300°C(1min) → 20°C/min → 320°C(2.5min)	230	300	300	20	29 - 600	1.3	non	Ultra ALLOY-5 30m x 0.25mm x 0.25µm
[9]	445	10	-	100°C → 20°C/min → 180°C → 5°C/min → 290°C → 20°C/min → 340°C (15 min)	n.a	n.a	280	splitless	n.a	n.a	non	SGE BPX 5 30m x 250µm x 0.25µm
[9]	350	n.a	-	80 °C → (10°C/min) →320°C	n.a	300	n.a	50	50 - 500	50	non	Ultra Alloy Phthalate (FrontLab): 30m x 0.25mm x 0.05µm
[10]	375	20	-	40°C(4 min) → 10°C/min → 320°C (18 min)	n.a	n.a	300	30	15 - 650	n.a	non	J & W Scientific DB-5 30m x 0.25mm x 1µm
[11]	340	60	-	80°C → (20°C/min) → 300°C (5min)	230	300	320	50	50 - 1000	52.1 cm/s	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
[12]	340	60	-	80°C → (20°C/min) → 300°C (5min)	230	300	320	50	50 - 1000	52.1 cm/s	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
[13]	320	60	-	40°C → (20°C/min) →320 °C	300	300	300	20	n.a	1	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
[14]	340	60	-	80°C → (20°C/min) → 320°C (3min)	300	300	300	20	n.a	1	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
[15]	315; 423; 500; 590	10	-	-20°C → 20°C/min → 300°C (5min)	230	n.a	270	n.a	10 - 760	180	-20	DB-5HT 15m x 0.25mm x 0.1µm
[16]	950	20	-	40°C(4 min) → 10°C/min → 320°C (18 min)	n.a	n.a	300	30	15 - 650	n.a	non	J & W Scientific DB-5 30m x 0.25mm x 1µm

**Table 4** (continued)

Ref.	Pyrolysis T° (°C)	Pyrolysis time (sec)	Thermochemo analysis	GC-MS oven program	Ion source T° (°C)	Transfer line T° (°C)	Injection T° (°C)	Split	Scan Range (amu)	Vent flow (mL/min)	CIS	Column
[17]	250	n.a	TMAH + sulfuric acid	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	non	n.a
[18]	100 & 350	15	-	40°C → 10°C/min → 300°C	n.a	n.a	n.a	50	30 - 550	n.a	non	Type of column: n.a 30 m x 0.25 mm
[19]	320	n.a	TMAH	40°C → 10°C/min → 150°C → 20°C/min → 320°C (3min)	n.a	n.a	n.a	30	n.a	n.a	non	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05µm
[20]	770	n.a	SE - dissolution	120°C → 12°C/min → 250°C	250	n.a	125	n.a	n.a	30	non	Porapak QS 1.6m x 0.4mm
[22]	950	20	-	40°C(4 min) → 10°C/min → 320°C (18 min)	n.a	n.a	300	30	15 - 650	n.a	non	J & W Scientific DB-5 30m x 0.25mm x 1µm
[25]	800	n.a	SE	70°C → 5°C/min → 130°C	n.a	n.a	n.a	splitless	n.a	2.43	non	Quadrex capillary aluminum clad 25 m x 1.7 mm I.D.
[27]	500	0.5	TMAH	100°C → 10°C/min → 250°C → 5°C/min → 275°C → 15°C/min → 320°C (5min)	230	280	300	30	35 - 400 + SIM	1	non	DB5 fused-silica 30m x 0.25 mm x 0.25µm
[28]	300 & 500	5	-	50°C → (20°C/min) → 250°C	250	n.a	n.a	100	n.a	1.5	non	Type of column: n.a 50 m
[29]	650	20	SE	50°C (2min) → 8°C/min → 310°C (0.5min)	250	300	300	25	50 - 650	1.6	non	DB5-HAT 30m x 0.25mmx0.10µm
[30]	275	90	-	30°C (4min) → 10°C/min → 320°C (7min)	n.a	n.a	n.a	splitless	n.a	1	-50	HP-5MS (Agilent) 30m x 0.25 mm x 0.25µm
[31]	350	125	Microwave assisted SE	40°C (5min) → 10°C/min → 310°C (20min)	n.a	280	280	10	35-700	n.a	non	HP-5MS (Agilent) 30m x 0.25 mmx 0.25 µm
[32]	260	n.a	-	40°C (5min) → 10°C/min → 310°C (20min)	230	280	280	10	35-700	1.2	non	HP-5MS (Agilent) 30m x 0.25 mmx 0.25 µm
[33]	260	n.a	-	50°C (1min) → (20°C/min) → 270°C (5min)	n.a	n.a	n.a	20	25 - 500	20	non	HP-INNOWAX 30m x 0.25 mm x 0.25 µm

n.a: not available

[1]: Fries et al. (2013) ; [2]: IEC (2017) ; [3]: Kudo et al. (2019); [5]: Herrera et al. (2003); [6]: Kim et al. (2016); [7]: Maruyama et al. (2015); [8]: Randle et al. (2013); [9] Riess et al. (2000); [10]: Wang (2000c) ; [11]: Yanagisawa et al. (2018) ; [12]: Yanagisawa et al. (2019); [13]: Hosaka et al. (2005) ; [14]: Yuzawa et al. (2008) ; [15]: Rial-Otero et al. (2009) ; [16]: Wang (2000a) ; [17]: Manabe et al. (1999) ; [18]: Jansson et al. (2007); [19]: FrontierLab - Tech note - Irganox ; [20]: Perlstein and Orme (1985); [22]: Wang (2000b) ; [23]: Hermabessiere et al. (2020) ; [25]: Roberson and Patonay (1990) ; [27]: Becerra and Odermatt (2012) ; [28]: Lichtenstein and Quellmalz (1983); [29]: Sitholé et Pimentel (2009) ; [30]: Kleine-Benne and rose (2011) ; [31]: La Nasa et al.,2021 ; [32]: La Nasa et al., 2019 ; [33]: Kim et al. 2017.

### 3.2.1. The importance of pyrolysis temperature

The pyrolyser thermal program is one of the main factors for a successful extraction using Py-GC/MS (Kim et al., 2016). The pyrolysis temperature, along with other factors such as the type of additive, their molecular weight, their concentration and the type of polymer they are included in, affect the result of pyrolysis extraction and thus GC/MS detection. To select pyrolysis temperature, a compromise must be made between the mobilization of the undestroyed additive along with characteristic pyrolysis products and the ease of interpretation of pyrograms (Riess et al., 2000).

The level of fragmentation is crucial for the identification of an additive in a polymer. The degree of fragmentation depends on the temperature selected for pyrolysis (Bart, 2001). A distinction can be made between the volatile and semi-volatile compounds present in a polymer by adjusting the temperature of the analysis, or by applying two or several progressive temperature runs to the sample before flash pyrolysis. A mild pyrolysis temperature *e.g.* around 250°C, can desorb the most volatile constituents, for example the most volatile phthalates DMP and DEP, with MWs of 194 g/mol and 298 g/mol and vapour pressures of  $2.63 \times 10^{-1}$  and  $6.48 \times 10^{-2}$  Pa, respectively (Hosaka et al., 2015). In addition, minor fragmentation of the additives is expected and more structural information on the original molecule is acquired. At higher temperatures, but still below pyrolysis temperatures, *e.g.* between 300°C to 450°C, larger molecules, such as many antioxidants, larger plasticizers (DBP, BBP, DEHP, DNOP), and flame retardants are revealed (Jansson et al., 2007). However, at too high temperatures, many different decomposition products are formed, the polymer starts to degrade into oligomers, and the excess of such polymer fragments severely interfere with the identification of characteristic additive fragments and may complicate the interpretation of the results (Bart, 2001).

The concentration of the additive in the polymer affects its detection with Py-GC/MS. At a low temperature, only the component present at high concentrations will show a clear peak in the pyrogram, provided that it is volatile. For example, in Riess et al. (2000) study, at the lowest tested temperature (315°C), only octabromodiphenyl oxide, which is one of the main components present in the flame retardant commercial mixture, was identified. For compounds with low volatility or low concentration in the polymer, or, as mentioned above, with a relatively high molecular mass, no or only low concentrations are mobilized at low temperatures.

### 3.2.2. The influence of the type of molecule on the selection of an appropriate pyrolysis temperature

Certain additives, in general flame retardants, many antioxidants and light stabilizers show higher retention times than the other additives. This is related to their polarity, their high MW and relatively high thermal stability (Bart, 2001; Riess et al., 2000). Because these macromolecules are not or only slightly volatile, they must be pyrolysed at higher temperatures and, sometimes, according to the decomposition temperature of the polymer, along with the polymer matrix. Hosaka et al. (2005) study demonstrated the influence of pyrolysis temperature on additive extraction and on the signal intensity of a low volatile compound such as decaBDE. This study showed that this flame retardant is thermally stable at temperatures between 300°C and 370°C, the peak intensities are almost constant, but decompose at temperatures above 380°C. Therefore, they set the optimum temperature at 320°C. This mild temperature is suitable for various other additives. For example, the same temperature was chosen by Randle et al. (2013) for the analysis of plasticizers (phthalates, diisononyl hexahydrophthalate (DINCH) (PubChem CID: 11524680) and di-octyl adipate (DOA) (PubChem CID: 31271)) and prescribed by the American Society for Testing and Materials ASTM-7823:14 (2014) in their method for determination of low-level, regulated phthalates in PVC plastics using Py-GC/MS. Moreover, at 320°C, the polymer is not decomposed nor analysed and remains in the sample cup. Yanagisawa et al. (2018) tested pyrolysis heating temperatures of up to 340°C on different materials, such as short-chain chlorinated paraffins (SCCPs), decaBDE, hexabromocyclododecane (HBCD) (PubChem CID: 15724678), and the plasticizer DEHP. They noted that temperatures between 300°C and 350°C were suitable to ensure a sufficient MS peak area for decaBDE, *i.e.* the less volatile compound, and did not create any adverse effect on the other analytes.

The 300-350°C temperature range seems to be the most relevant range, because the majority of studies use this range of temperature (Table 4).

### 3.2.3. The influence of polymer type

It is important to consider the nature of the polymer in which the analyses are carried out. A pyrolysis temperature solely based on the nature of the additives may not be optimal. Some polymers are more thermally labile than others. Polystyrene (PS) and PVC start to decompose at relatively low temperatures, contrary to PE and PP (Bart, 2001). For example, for the analysis of decaBDE in PS, Yuzawa et al. (2008) showed that PS starts to pyrolyse around 300°C with maximum pyrolysis when the temperature reaches 340°C. At this

temperature, the simultaneous pyrolysis of PS along with the desorption of the additive can cause contamination of the column with styrenic compounds, especially if repeated measurements for the same sample are done. Therefore, to avoid contamination, the highest pyrolysis temperature to analyse deBDE in a PS sample matrix, was set to 340°C. This temperature allowed them to reach a TD recovery rate around 60% for decaBDE and the rest of the molecule remained in the residual PS in the pyrolysis sample cup.

Despite this knowledge and experimentation, it is still complicated to analyse plastic additives using a global and standardized method, especially for complex matrices like plastics. Analysing plastic additives using Py-GC/MS has certain limitations. In particular, the simultaneous screening of different additives is often performed using constant conditions that are not necessarily optimized for the quantification of each individual substance and all polymeric matrices. Several studies have published screening methods for certain restricted phthalates (Fries et al., 2013; IEC, 2017; Kim et al., 2016; Kudo et al., 2019; Maruyama et al., 2015; Yuzawa et al., 2009). However, to the best of our knowledge, for the diversity of plastic additives that are used in plastic goods, only one study (Yanagisawa et al., 2019) has implemented a screening technique using double-shot Py-GC/MS for various harmful additives, *e.g.* plasticizers and flame retardants, in different polymeric materials. Although this study made remarkable progress toward the use of Py-GC/MS for the screening of plastic additives, the efficiency of this polyvalent method is not equivalent for all analysed additives.

#### 4. Conclusion

Pyrolysis-GC/MS is a good method with the major advantage of being able to rapidly analyse a single sample to determine the organic plastic additives and polymer type successively using different temperatures conditions: sub-pyrolysis for the thermal desorption of OPAs and higher pyrolysis temperatures for the characterization of polymers. Another advantage, in comparison with traditional chemical techniques, is that no extensive sample preparation is required, thereby minimizing sample preparation steps and limiting potential background contamination. Thus, multi-shot pyrolysis-GC/MS provides a fast and reliable procedure to characterize both volatile additives and polymers in the same sample. Due to the great variety of polymer types and additives, the identification can be complicated by the superimposed and overlapping characteristic peaks of the additives themselves or from the degraded polymer. All of which can interfere with the separation and the identification of the targeted compounds. Additionally, considering that more and more of these additives are regulated, developing a fast identification method for all compounds and extending the scope of screening has become a challenge.

The results from different studies suggest that major additives present in various polymeric materials can be determined simultaneously using Py-GC/MS. Depending on the purpose of the studies and the type of analysed additive, different types of devices can be set up. They include multi-step pyrolysis temperature separations, or the derivatization of certain products to overcome some limitations that can be encountered, especially for the detection of polar or high molecular weight molecules.

Qualitative and quantitative analysis require a rigorous approach to ensure instrumental and sampling repeatability. The majority of Py-GC/MS analyses on OPAs are qualitative. Although semi-quantitative analyses are possible, it remains difficult to obtain suitable quantitative data from pyrolysis studies, and this constitutes one of the major drawbacks of Py-GC/MS, particularly in light of the fact that polymer additives can be present in low concentrations. Mass detectors are sufficiently sensitive to detect plastic additive pyrolysate compounds and selecting ions with a SIM mode can simplify the identification of the compounds, thereby improving the sensitivity and lowering the limits of detection. It is recommended that each sample should be measured, if feasible, using the full-scan mode together with the SIM mode, especially for the analysis of trace additives. However, future work needs to focus on the improvement of this method for sensitive quantitative analysis that will lead to a robust, standardized analytical procedure for compounds present at low levels.

#### 5. Acknowledgments

The authors are very grateful to the Hauts-de-France Regional Council and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) for financially supporting Fleurine Akoueson's PhD scholarship. This work was also funded by the European Union (ERDF), the French government, the Hauts-de-France Regional Council and IFREMER, in the framework of the CPER MARCO project (2015-2020).

#### 6. Authors contribution

**Fleurine Akoueson:** Conceptualization, data curation, investigation, methodology, writing - original draft, writing - review & editing. **Chaza Chbib:** Conceptualization, investigation, methodology, writing - review & editing. **Sébastien Monchy, Ika Paul-Pont & Périne Doyen:** Writing - review & editing. **Alexandre Dehaut & Guillaume Duflos:** Conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, supervision, writing - review & editing.

#### 7. References

Les références sont listées page 184 du présent manuscrit.



#### 4.3.2. Contribution de l'étude

Cette étude bibliographique présente l'utilité de la technique Py-GC-MS pour l'analyse des APOs et des polymères plastiques en explorant les recommandations et les différents critères à prendre en compte pour une analyse réussie.

Les méthodes de Py-GC-MS présentent l'avantage majeur de pouvoir analyser rapidement un seul échantillon pour déterminer les APOs et les polymères séparément par deux ou plusieurs analyses successives. C'est ce qu'on appelle la pyrolyse « multi-shot » ou « multi-step ». La(les) première(s) étape(s) applique(nt) une température sub-pyrolytique, *i.e.* en dessous de 500 °C, généralement autour de 350 °C, le terme alors utilisé est la thermodésorption (TD). A ce stade les polymères ne seront pas déstructurés, sauf exception comme le PS, et seuls les additifs seront désorbés et identifiés indépendamment du polymère. La seconde étape se fait à des températures supérieures à 500 °C (généralement autour de 650 °C), le terme de pyrolyse est alors employé. Lors de cette étape, la matrice polymérique est dégradée et le type de polymère peut être déterminé selon les fragments produits. L'emploi d'un pyrolyseur pour effectuer une TD peut être qualifié de Py/TD-GC-MS (Herrera et al., 2003).

Contrairement aux autres techniques, cette approche offre deux avantages majeurs :

- La simplification de l'identification des composés, grâce à la séparation de l'extraction et de l'identification des additifs et des polymères. Ceci permet d'éviter ou de limiter les interférences entre matrice polymérique et additifs et facilite la lecture du spectre de masse en évitant que les produits issus de la dégradation des polymères (plus abondants) ne masquent les additifs désorbés.
- L'absence ou la réduction des étapes de préparation des échantillons, notamment concernant l'extraction des additifs, en amont de l'analyse. Ceci réduit le temps et les coûts de l'analyse et limite les risques de contamination extérieure.

De plus, face à la multitude de composés d'additifs déjà utilisés ou allant être mis sur le marché et aux dernières réglementations impliquant un remplacement de molécules actuellement largement utilisées (cf. partie 1.3.2), la mise au point d'une méthode d'identification rapide permettant le screening d'une multitude de composés est devenu un défi pour lequel la Py/TD-GC-MS peut apporter des réponses.

Néanmoins, malgré les nombreux avantages de la pyrolyse et les applications de plus en plus nombreuses pour l'analyse des APOs, la review a cependant mis en évidence une limite pour l'analyse de certaines molécules (*e.g.* polaires ou de haut poids moléculaire) nécessitant par exemple une étape supplémentaire de dérivation. De plus, les méthodes utilisant la pyrolyse souffrent d'un manque de standardisation, comme dans la plupart des méthodes concernant des plastiques, et l'aspect quantitatif

n'est pas encore au point, ce qui constitue l'un des principaux inconvénients des analyses par pyrolyse. De ce fait, un effort de recherche doit aussi se porter sur la mise en place et l'amélioration de méthodes quantitatives qui permettront le dosage des APOs.

Compte tenu des différents avantages qu'offre la pyrolyse dans l'analyse des plastiques (polymères et additifs), il a été décidé de s'intéresser à la Py/TD-GC-MS pour mettre au point et appliquer une méthode d'identification multicomposés pour thermodésorber directement des OPAs de matrices polymériques.



# CHAPITRE 2

---

## **Identification d'additifs plastiques par Py/TD-GC-HRMS**

Développement méthodologique et  
application

## **Chapitre 2 : Identification d'additifs plastiques par Py/TD-GC-HRMS**

### **1. Préambule**

La mise en évidence de la toxicité de certaines molécules d'additifs plastiques, de leur capacité à migrer dans le milieu environnant (eau, organismes, aliments) et leur présence dans l'environnement et dans de nombreuses espèces de produits de la mer (Chapitre 1), a fait des additifs plastiques un sujet de préoccupation et d'intérêt scientifique croissant.

Le second objectif de ce travail de thèse a été de développer une méthode qualitative pour l'identification d'une sélection d'additifs plastiques organiques en utilisant la Py/TD suivie d'une analyse en chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse haute-résolution GC-HRMS (Article 2). Puis, dans un second temps, la méthode développée a été appliquée sur différents échantillons de plastiques et MPs :

- Quatre échantillons de barquettes alimentaires en PP et PLA. (Article 2 – partie 2.1)
- Deux échantillons de granulés commerciaux en PP et PE (partie 2.2). Cette analyse a été effectuée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'océanologie et de géosciences (LOG) de Wimereux. Une partie des résultats a été valorisée dans la publication de Uguen et al. (2022 (Article 3 - Annexe 2).

## 2. Développement et application d'une méthode en Py/TD-GC-HRMS pour identifier les additifs plastiques organiques

### 2.1. Identification d'additifs plastiques organiques : développement d'une méthode en Py/TD-GC-HRMS et application sur des packagings alimentaires

Les résultats de cette partie ont été valorisés par la rédaction d'un article scientifique, publié dans le journal *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (**Article 2**). Cet article est présenté ci-après. Ce travail a également conduit à la création et à la mise à disposition d'une base de données (**Annexe 1**), sous licence Creative Common attribution 4.0 international, contenant les spectres de masse haute résolution de 56 additifs sur le site Zenodo : <https://doi.org/10.5281/zenodo.6599058>.

#### 2.1.1. Objectif de l'étude et démarche expérimentale

L'objectif principal de cette étude était de développer une méthode qualitative pour l'identification d'APOs en Py/TD-GC-HRMS.

Ce travail a été découpé en différentes sous-étapes illustrées dans la **Figure 8** et détaillées ci-dessous.

##### (i) La sélection d'additifs d'intérêt

56 additifs organiques d'intérêt ont été sélectionnés sur la base de différents critères tels que leurs fonctions, leurs concentrations estimées dans les plastiques, leurs concentrations dans l'environnement et dans divers organismes, et, si cela était disponible, la faisabilité de leur analyse en GC-MS.

##### (ii) Le développement d'une méthode analytique en Py/TD-GC-HRMS

La mise en place de la méthode a nécessité plusieurs étapes. Dans un premier temps, diverses méthodes déjà publiées concernant l'analyse de différents APOs en GC-MS et Py-GC-MS, ont été compilées dans le but d'obtenir une méthode globale en GC-MS, commune aux 56 molécules sélectionnées.

Dans un second temps, la méthode GC-MS sélectionnée a été appliquée en injection liquide pour l'ensemble des additifs sélectionnés, afin d'obtenir des données spectrales haute-résolution et créer une base de données spectrale.

Pour finir, une étape d'extraction thermique des additifs a été ajoutée en amont de la méthode GC-MS, en utilisant un pyrolyseur (Py/TD). Une phase d'optimisation sur la préparation de l'échantillon et la sélection de la température de désorption a été effectuée. Premièrement, dans le but de faciliter l'expérimentation et de réduire la volatilité de certains additifs, quatre supports ont été testés (*i.e.* un tube de pyrolyse vide ou bien un tube de pyrolyse contenant soit un morceau de laine de quartz, soit

un morceau de filtre en quartz soit de la terre de diatomées). Enfin, concernant la température de thermodésorption, trois températures différentes (250, 350 et 450°C) ont été testées en pyrolysant 1µL de solution mère de chaque additif, et en comparant la réponse de leurs pics caractéristiques.

(iii) L'application de la méthode finale de Py/TD-GC-HRMS sur différents échantillons.

La méthode développée a été appliquée sur quatre échantillons de barquettes alimentaires. Deux échantillons en PP et deux échantillons en PLA, chacun provenant de deux fournisseurs différents, ont été sélectionnés et analysés dans le but d'identifier les APOs présents dans leurs matrices polymériques et de comparer d'éventuelles différences entre les polymères et les fournisseurs.

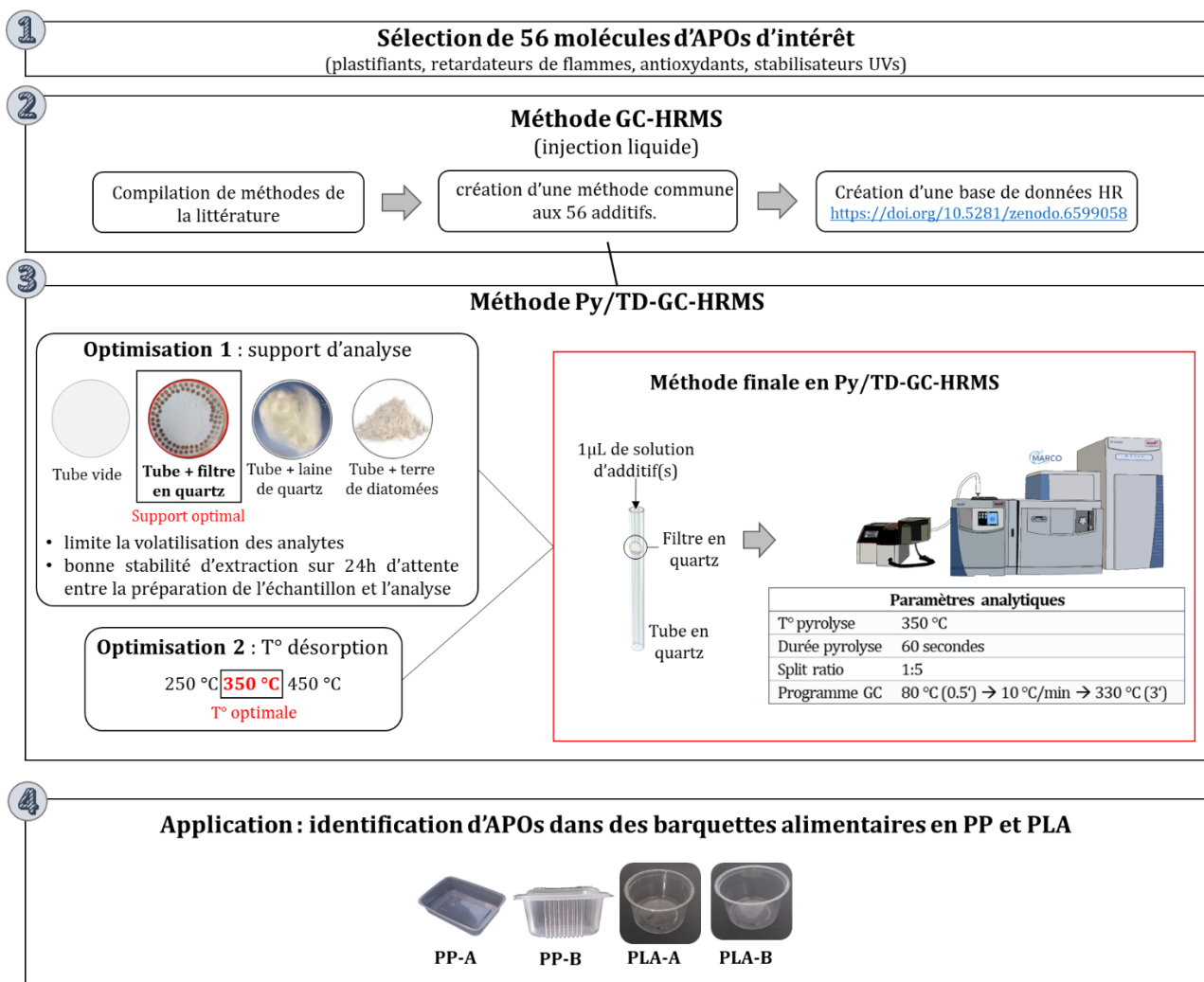


Figure 8 : Schéma de synthèse de l'objectif et de la démarche expérimentale de l'étude présentée dans l'article 2 relative à la mise en place d'une méthode d'identification d'additifs plastiques organiques (APOs) en Py/TD-GC-HRMS et à son application sur des échantillons de barquettes alimentaires en polypropylène (PP) et en acide polylactique (PLA).

## 2.1.2. Article 2

**Identification of plastic additives: Py/TD-GC-HRMS method development and application on food containers.**

**Fleurine Akoueson<sup>1,2</sup>, Chaza Chbib<sup>3</sup>, Armance Brémard<sup>1,5</sup>, Sébastien Monchy<sup>3</sup>, Ika Paul-Pont<sup>4</sup>, Périne Doyen<sup>2</sup>, Alexandre Dehaut<sup>1</sup>, Guillaume Duflos<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> ANSES – LSAI, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

<sup>2</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, EA 7394, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Uni. Liège, F-62200, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Univ. Lille, UMR 8187, LOG, F 62930 Wimereux, France

<sup>4</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

<sup>5</sup> Université Paris Saclay, Bât. 349, 91405 Orsay Cedex, France

Corresponding author: [Guillaume.duflos@anses.fr](mailto:Guillaume.duflos@anses.fr)

**Abstract**

The interest of studying organic plastic additives (OPAs) is growing since many of them are considered as toxic for human beings, marine organisms and have been found in the ecosystem. The impact and the extent of this pollution is not fully understood because of the lack of methods able to comprehensively analyze the wide diversity of OPAs. This study aims at offering a quick and efficient way to identify specific harmful plastic additives in polymer materials. For this purpose, a general method, for identifying 49 OPAs, has been successfully developed using pyrolyzer/thermal desorption-gas chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometer (Py/TD-GC-HRMS). The retention indices were calculated for each compound and a high-resolution mass spectra database for plastic additives was implemented. This method was then applied to characterize the OPAs included in food containers that are frequently found in the environment. Four samples made of polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA) coming from two distinct suppliers were then selected. A total of 10 additives, which were plasticizers (phthalates and adipates), antioxidants (bisphenol B) and phosphorous flames retardants, were found in these food packaging. Generally, higher peak signals were detected in the PP samples in comparison to PLA samples, except for tributyl phosphate and bisphenol B that were exclusively found in PLA samples. Moreover, the experimentations pointed out additives differences between suppliers, for products intended for the same use and made of the same polymer, for both PP and PLA samples highlighting the complexity of identifying and generalizing the additive content of plastic materials.

**Keywords**

Phosphorous flame-retardants, Plasticizers, antioxidants, UV stabilizers, Py/TD-GC-HRMS, analytical method development.

**1. Introduction**

Plastic pollution is a threat for the environment and marine organisms (Groh et al., 2019). The presence of plastics is ubiquitous in the environment. In 2020, plastic production reached 307 million metric tons worldwide (PlasticEurope, 2021), of which 24% were used for food and beverages packaging (PlasticEurope, 2020). These items are in the top ten of the most common plastic waste found in the environment (Gerigny et al., 2018).

A key concern of plastic pollution is linked to the risks to both ecosystem and human health. These adverse effects classified in several categories including the “physical” effects related to the inhalation and ingestion of plastic debris and the

“chemical” effects related to the harmful chemicals associated with plastics such as the organic plastic additives (OPAs) included in the polymer (Campanale et al., 2020; Kumar et al., 2021). While the “physical” impacts of plastics are well described in the literature, the “chemical” impacts, partly related to the presence of OPAs, is less documented and limited information is available for the majority of them. Several categories and families of OPAs exist, sorted by decreasing total amounts in polymers: plasticizers, flame retardants, colorants, antioxidants, heat stabilizers, UV stabilizers or bio-stabilizers (biocides), lubricants, foaming agents, and antistatic agents. These chemicals are added to polymers during their formulation, without being chemically bound to polymers (Hahladakis et al., 2018), in order to confer



them specific properties and advantages. However, there are increasing concerns about their impacts on marine organisms or human health since some of them were found to be toxic (Hahladakis et al., 2018). Indeed some phthalates, nonylphenols (NPs), Bisphenols, as well as some brominated flames retardants (BFRs) have been identified as carcinogens, mutagens and may have detrimental impacts on the reproduction being endocrine disrupting chemicals (Eladak et al., 2015; Groh et al., 2019; Lithner et al., 2011; Serra et al., 2019; Sheikh and Beg, 2019). As most of the OPAs are not chemically bound to the polymeric matrix, they can leach into the surrounding environment or can be transferred to marine organisms or humans upon plastic debris uptake (Koelmans et al., 2014; Kumar et al., 2021; J. Muncke et al., 2020; Rochman et al., 2013). Additionally, OPAs may migrate from the packaging leading to contamination of the food packed (Fasano et al., 2012; Garde et al., 1998; Schmid and Welle, 2020; Tanaka et al., 2003). As a result, the use of OPAs in plastics has become controversial and the assessment of their nature and toxicity is of utmost importance.

A considerable number (more than 5300) of polymer formulations are available on the market, and more than 4000 known chemicals are used in the formulation of plastic packaging, *i.e.* intentionally added substances (IAS). Additionally, plastic packaging may contain non-intentionally added substances (NIAS) (Kato and Conte-Junior, 2021; Zimmermann et al., 2019). That demonstrates the chemical complexity of plastic polymers. The identity of most IAS and NIAS are unknown making difficult to assess the safety of plastic materials, especially in regards with food contact materials (FCM). In order to broaden understanding of the chemical impact of these additives, it is necessary to have a more-detailed assessment of plastic packaging associated chemicals. This involves the development of robust analytical method to identify and quantify them. The analysis of OPAs in polymers is an analytical challenge because of the wide array of their chemical compositions and the diversity of the molecules mixed within a polymer. Also, the most frequently used processes, *e.g.* solvent extraction (SE), present constraints. These methods are time consuming for the sample preparation, generate wastes and involve the use of toxic solvents. Besides, there is no universal solvent able to dissolve all types of polymers (Bart, 2001; Hermabessiere and Rochman, 2021; Kudo et al., 2019; Wang, 2000c). Under such circumstances, the need of avoiding the complexity of analytical processes is of concern. Pyrolysis coupled to a gas chromatography and a mass spectrometry (Py-GC-MS) is an analytical tool that enables relatively quick and easy analyses (Akoueson et al., 2021). Moreover, this technique minimizes the sample preparation steps, limiting the potential contamination prior to the analysis and does

not require the use of toxic solvents (Bart, 2001; Kim et al., 2016; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2017; Maruyama et al., 2015). Analytical pyrolysis also offers a major advantage. It permit to successively analyze both the OPAs and the polymer with a multi-step approach including an initial thermal desorption (TD) step at sub pyrolytic temperatures (*i.e.* approximately <500 °C) to characterize the additives regardless of the polymer, and a second pyrolysis step at higher temperatures (*i.e.* >500 °C) to analyze the polymeric matrix (Herrera et al., 2003; Jansson et al., 2007; Okoffo et al., 2020). Py-GC-MS has already been reported as beneficial to thermally desorb and screen plastic additives in several studies using pyrolyzer/thermal desorption (Py/TD) GC-MS methods (International Electrotechnical Commission, 2017; Kim et al., 2017; Yanagisawa et al., 2018) and is a recognized method for the fast identification of OPAs. Akoueson et al., (2021) review, listed a wide array of OPAs studied using Py and Py/TD-GC-MS (Akoueson et al., 2021). However all the developed methods focused on few analytes from a type of additives. No general method exists to analyze a wider diversity of additives. Thus, we aimed to develop a TD method able to identify diverse harmful, emergent, or widely used OPAs.

The objectives of the present study are: (i) set up a high-resolution Mass spectral library which includes a selection of OPAs used as plasticizers, flame retardants, antioxidants and stabilizers, (ii) implement a general analytical method using Py/TD-GC-HRMS to identify and detect the selected plastic additives, and (iii) apply the method to several items of food packaging materials in order to characterize their OPAs content.

## 2. Material and method

### 2.1. Implementation of a general GC-HRMS method for OPAs detection

#### 2.1.1. Targeted additives, reagents and preparation of the samples

According to different criteria, detailed in part 3.1, 56 additives were selected. The additives and their corresponding suppliers are listed in Table 1.

**Table 1:** selected organic plastic additives (OPAs) with their corresponding suppliers and the quantity that allowed peaks detection using Py-GC-HRMS analysis. The molecules tagged with "\*" represent the OPAs not detected (n.d) at the highest concentration available.

N°	Additive	Abbreviation	CAS	Suppliers	Limit of detection (ng) (split 5)	
<b>Plasticizers</b>						
1	Dimethyl phthalate	<b>DMP</b>	<b>131-11-3</b>	Restek	5	
2	Diethyl phthalate	<b>DEP</b>	<b>84-66-2</b>			
3	Di-allyl phthalate	<b>DAIP</b>	<b>131-17-9</b>			
4	Diisobutyl phthalate	<b>DIBP</b>	<b>84-69-5</b>			
5	Di-n-butyl phthalate	<b>DBP</b>	<b>84-74-2</b>			
6	Tributyl Acetyl Citrate	<b>ATBC</b>	<b>77-90-7</b>	Accustandard	25	
7	Di-n-hexyl phthalate	<b>DHP</b>	<b>84-75-3</b>	Restek		
8	Benzyl butyl phthalate	<b>BBP</b>	<b>85-68-7</b>			
9	Bis-2-Ethylhexyl Adipate	<b>DEHA</b>	<b>103-23-1</b>	Accustandard		
10	Diisoheptyl phthalate	<b>DIHP</b>	<b>71888-89-6</b>	Accustandard		
11	Tri(2-ethylhexyl) phosphate	<b>TEHPA *</b>	<b>78-42-2</b>	Accustandard		n.d (at 100)
12	Dicyclohexyl phthalate	<b>DCHP</b>	<b>84-61-7</b>	Restek		5
13	Bis(2-Ethylhexyl) phthalate	<b>DEHP</b>	<b>117-81-7</b>			
14	Diisononyl hexahydrophthalate	<b>DINCH</b>	<b>166412-78-8</b>	Accustandard		
15	Di-n-octyl phthalate	<b>DIOP</b>	<b>117-84-0</b>	Restek		
16	Diisononyl phthalate	<b>DINP</b>	<b>68515-48-0</b>	Accustandard	25	
17	Di-nonyl phthalate	<b>DNP</b>	<b>84-76-4</b>	Restek	5	
18	Diisodecyl phthalate	<b>DIDP</b>	<b>68515-49-1</b>	Accustandard	25	
<b>Flames retardants</b>						
19	Triethyl Phosphate	<b>TEP</b>	<b>78-40-0</b>	LGC standard	5	
20	Tripropyl Phosphate	<b>TPP</b>	<b>115-86-6</b>			
21	Tributyl Phosphate	<b>TBP</b>	<b>126-73-8</b>			
22	2,4,6-Tribromophenol	<b>2,4,6,TBP</b>	<b>118-79-6</b>	LGC standard		
23	Tris(2-Chloroethyl)Phosphate	<b>TCEP</b>	<b>115-96-8</b>	LGC standard		
24	Tris(2-Chloroisopropyl)Phosphate	<b>T CPP</b>	<b>13674-84-5</b>	LGC standard	10	
25	2,4,4'-Tribromodiphenyl ether	<b>BDE-28</b>	<b>41318-75-6</b>	Accustandard		
26	Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate	<b>TDCPP</b>	<b>13674-87-8</b>	LGC standard	5	
27	Triphenyl Phosphate	<b>TPhP</b>	<b>513-08-6</b>			
28	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether	<b>BDE-47</b>	<b>5436-43-1</b>	Accustandard	10	
29	Tricresyl Phosphate	<b>TCP *</b>	<b>1330-78-5</b>	Accustandard	n.d (at 100)	
30	Tricresyl Phosphate - isomer	<b>TCrP *</b>	<b>78-30-8</b>		n.d (at 100)	

Table 1 (continued)

N°	Additive	Abbreviation	CAS	Suppliers	Limit of detection (ng) (split 5)
<b>Flames retardants (continued)</b>					
31	2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether	<b>BDE-100</b>	<b>60348-60-9</b>	Accustandard	5
32	Tri-o-tolyl phosphate	<b>TToP *</b>	<b>78-30-8</b>	Accustandard	n.d (at 100)
33	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether	<b>BDE-99</b>	<b>189084-64-8</b>	Accustandard	10
34	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether	<b>BDE-153</b>	<b>68631-49-2</b>		
35	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether	<b>BDE-154</b>	<b>207122-15-4</b>		
36	2,2',3,4,4',5,6'-Heptabromodiphenyl ether	<b>BDE-183</b>	<b>207122-16-5</b>		
37	1,2-Bis (2,4,6 Tribromophenoxy) ethane	<b>BTBPE</b>	<b>37853-59-1</b>	LGC Standard	25
<b>Antioxidants</b>					
38	6,6'-di-tert-butyl-2,2'-thiodi-p-cresol	<b>Irganox® 1081</b>	<b>90-66-4</b>	Accustandard	10
39	Butylated hydroxytoluene	<b>BHT</b>	<b>128-37-0</b>	Accustandard	5
40	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamic acid, octadecyl ester	<b>Irganox® 1076</b>	<b>2082-79-3</b>	Accustandard	100
41	6,6'-ditert-butyl-4,4'-thiodin-m-cresol	<b>Lowinox® TBM-6</b>	<b>96-69-5</b>		50
<b>UV stabilizers</b>					
42	2,2-dihydroxy-4,4-dimethoxybenzophenone	<b>Uvinul® 3049 *</b>	<b>131-54-4</b>	Accustandard	n.d. (at 100)
43	2-t-Butyl-6(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	<b>UV-326</b>	<b>3896-11-5</b>		5
44	2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-pentylphenol	<b>UV-328</b>	<b>25973-55-1</b>		
45	2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	<b>UV-327</b>	<b>3864-99-1</b>		
46	2-hydroxy-4-octyloxybenzophenone	<b>Uvinul 3008 *</b>	<b>1843-05-6</b>		
<b>Antioxidants - plasticizers - stabilizers</b>					
47	4-Tert-Octylphenol	<b>4-t-OP</b>	<b>140-66-9</b>	Accustandard	5
48	Nonylphenol	<b>NPs</b>	<b>84852-15-3</b>	Accustandard	10
49	4-nonylphenol	<b>4-NP</b>	<b>104-40-5</b>	Accustandard	
50	Nonylphenol Monoethoxylate	<b>NP1EO</b>	<b>27986-36-3</b>	Accustandard	
51	Bisphenol F	<b>BPF</b>	<b>620-92-8</b>	Accustandard	5
52	4-Nonylphenol Monoethoxylate	<b>4-NP1EO</b>	<b>104-35-8</b>	Accustandard	10
53	Bisphenol A	<b>BPA</b>	<b>80-05-7</b>	Accustandard	5
54	Bisphenol B	<b>BPB</b>	<b>77-40-7</b>		
55	Nonylphenol diethoxylate	<b>NP2EO *</b>	<b>N/A</b>	Accustandard	n.d. (at 10)
56	Bisphenol S	<b>BPS *</b>	<b>80-09-1</b>	Accustandard	n.d (at 100)

A standard mixed solution of C<sub>3</sub>-C<sub>33</sub> n-alkanes (Cat. No. 40147-U) was purchased from RESTEK (Lisses, France). Analytical GC grade solvents were used such as methanol, acetone, toluene or acetonitrile and were all purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Diluted solutions of each additives stock solutions were prepared in suitable solvents at concentrations ranging from 0.05 to 100 mg.L<sup>-1</sup>. The diluted solutions were then transferred and conserved in 2 mL GC autosampler vials with a PTFE coated seal. An aliquot of 1 µL of each additive solution was injected in the GC-HRMS using a microliter syringe at increasing concentrations (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 mg.L<sup>-1</sup>) until visualization of the limit of detection additives when the signal to noise (s/n) was > 3. For the mixed n-alkanes, 1 µL of the 10 mg.L<sup>-1</sup> solution was also injected.

### 2.1.2. GC-HRMS method and parameter settings

Samples were analysed using a GC Trace 1310-MS Orbitrap Q-exactive from ThermoFisher Scientific (Les Ulis, France) equipped with a TriPlus RSH auto-sampler. The compounds in standard solutions were separated on a 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm RXi-5ms capillary column acquired from Restek (Lisses, France). The injection volume was 1 µL.

Based on the literature, several methods (Supplementary data S1) were compiled in order to propose a compromise, *i.e.* a general method suitable for the 56 selected additives, being aware of its limitations regarding the analysis sensitivity for each additive. Analytical conditions are detailed in Table 2.

Chromatograms were analyzed using Thermo Scientific Xcalibur software (4.3.73.11) and with the help of an automated search for the markers by deconvolution using TraceFinder™ software (5.0.889.0). The identity of the additives was confirmed using target and confirming ions obtained from the literature (Bolgar et al., 2016; Chattelier and Lestremau, 2014; Espejo et al., 2002; Frederiksen et al., 2007; Gimeno et al., 2014; Zhang, 2019) and the National Institute of Standards and Technology (NIST) Database.

### 2.1.3. Construction of the database

Following the acquisition, and after obtaining robust chromatograms signals for all the analytes, a database containing mass spectra for all the detected additives was implemented using TraceFinder software including quantitative and qualitative ions for each molecule, as specific as possible. The HRMS files are available on Zenodo (Akoueson et al., 2022).

Following the analysis of the standard additives solutions and the mixed *n*-alkane solution, the retention time (RT) of the additive analytes and the *n*-alkanes were used to calculate the Kováts retention indices (RI) following equation (1).

Respective RI were calculated (Castello et al., 2009) and registered in the database. The RI were validated when the calculated values were in the range of RI values found in the literature.

$$RI = 100 \times (C_{n+1} - C_n) \times \left[ \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} \right] + 100 \times C_n \quad (1)$$

With the carbon numbers of *n*-alkanes eluted before (C<sub>n</sub>) and after (C<sub>n+1</sub>) the corresponding target molecule, retention time of the target molecule expressed in min (t<sub>x</sub>) and retention times for C<sub>n</sub> (t<sub>n</sub>) and C<sub>n+1</sub> (t<sub>n+1</sub>) for the flanking *n*-alkanes expressed in min.

The RI and the specific qualitative and quantitative ions are gathered for each additive in Table 3.

Parameters	Settings
<b>GC</b>	
Injection port temperature	300°C
Column temperature (°C)	80°C (0.5 min) → 10°C/min → 330°C (3 min)
Injection mode	Split (split ratio 1: 5)
Carrier gas	Helium
Carrier Gas flow	1 mL.min <sup>-1</sup>
Transfer line temperature	300°C
<b>MS</b>	
Ion source temperature	300°C
Ionization method	Electron Ionization (EI) 70 eV.
Analytical mode	Full Scan mode (FS)
Scan Range	30.00000 - 750.00000 m/z
Solvent Delay	5 min

**Table 2:** GC-HRMS analytical conditions

**Table 3:** Kováts retention indices (RI) values and quantitative and qualitative ions for the selected plastic additives molecules. n.d. = not detected.

Molécules	RI	Quantitative ions	Qualitative ions
<b>Plasticizers</b>			
DMP	1469	163.03888	133.02846
DEP	1608	149.02333	177.05455
DAIP	1756	149.0231	189.05432
DIBP	1872	149.02333	161.05917
DBP	1972	149.02333	160.08830
ATBC	2160	129.01845	259.15451 ; 137.99502
DHP	2374	149.02333	234.12006
BBP	2401	149.02333	206.09376
DEHA	2404	111.04393	101.05960 ; 129.05444
DIHP	2380 - 2509	149.02333	265.14313 ; 99.11672
TEHPA	2477	98.98428	113.13261
DCHP	2558	149.02333	249.11210
DEHP	2570	149.02333	279.15909
DINCH	2630 - 2870	155.07002	109.06474 ; 127.07529
DIOP	2756	149.02333	261.14876
DINP	2731 - 2867	149.02323	71.08553
DNP	2936	149.02333	293.17474
DIDP	2876 - 3010	149.02332	n.d.
<b>Flames retardants</b>			
TEP	1124	98.98432	127.01567 ; 109.00512
TPP	1383	98.98432	141.03133
TBP	1650	98.98432	211.10963
2,4,6,TBP	1656	331.76931	222.85798
TCEP	1769	142.96611	222.96906 ; 248.98479
TCPP	1808	125.00023	201.00710 ; 156.98178
BDE-28	2283	245.96733	139.05414
TDCPP	2354	98.98432	190.94284 ; 154.96611
TPhP	2421	325.06296	233.03670 ; 215.02596
BDE-47	2550	325.87582	323.87792
TCP	2676	165.07015	243.05746 ; 368.11771
TCrP	2707		
BDE-100	2763	403.78613	563.62171
TToP	2738	165.07015	243.05746 ; 368.11771
BDE-99	2823	405.78452	563.62171
BDE-153	3000	483.69452	242.84599 ; 643.53162
BDE-154	3092		
BDE-183	3375	563.60352	281.80109
BTBPE	3453	356.79514	277.87637
<b>Antioxidants</b>			
Irganox® 1081	1366	149.09674	164.12027
BHT	1520	205.158752	206.16206
Irganox® 1076	3611	147.08102	263.16534 ; 217.15947
Lowinox® TBM-6	2795	358.19647	259.07922
<b>UV stabilizers</b>			
Uvinul® 3049	2503	151.03903	257.08099 ; 124.05204
UV-326	2575	300.08972	272.05853
UV-328	2681	322.19113	351.23003
UV-327	2692	342.13678	357.16034 ; 286.07428
Uvinul 3008	2790	213.05461	325.17978 ; 137.02342

Table 3 (continued)

Molécules	RI	Quantitative ions	Qualitative ions
<b>Antioxidants; Plasticizers; Stabilizers</b>			
<b>4-t-OP</b>	1611	135.08041	206.16644
<b>NPs</b>	1700 - 1770	135.08041	197.13233 ; 212.15582
<b>4-NP</b>	1873	107.04916	221.18555
<b>NP1EO</b>	1969 - 2030	179.10652	193.12220
<b>BPF</b>	2104	200.08276	n.d
<b>4-NP1EO</b>	2146	107.04916	151.07530 ; 264.20834
<b>BPA</b>	2221	213.09113	228.11452
<b>BPB</b>	2321	213.09065	227.10631
<b>NP2EO</b>	2027 - 2321	107.04916	151.07530 ; 264.20834
<b>BPS</b>	2765.2777	141.00046	110.03627

## 2.2. Thermodesorption method development for the detection of OPAs using Py/TD-GC-HRMS

A TD step using a Pyrolyser, CDS Analytical Pyroprobe 6150 from Quad Service (Oxford, PA US), was added to the GC-HRMS developed method.

### 2.2.1. Sample preparation optimization

Four protocols of sample preparation (Supplementary data S2) were previously tested in order to ease the analytical process and to reduce the high volatility of several low molecular weight additives. Briefly, the analysis of the selected plastic additives have been done by introducing 1  $\mu\text{L}$  of the additives stock solutions at concentrations ranging from 5 to 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The solutions were either added in an empty pyrolysis quartz tube or in a pyrolysis quartz tube containing three types of different materials used as "solution trapping matrix" such as a piece of quartz filter, a piece of quartz wool or a small amount of diatomaceous earth (silicium dioxide). These media were selected for their documented chemically inert features and their thermal resistance (Fields et al.; Kolahgar and Pfannkoch, 2002). In brief, considering the results (S2), the quartz filter was chosen as a suitable « trapping matrix » since it permit to stabilize the compounds despite the waiting time between the sample preparation and the analysis

### 2.2.2. Implementation of a general method using Py/TD-GC-HRMS device

The analyses were carried out using a Pyrolyser CDS Analytical Pyroprobe 6150 from Quad Service (Oxford, PA US) coupled to a GC-HRMS device (Trace 1310-MS Orbitrap Q-exactive, ThermoFisher Scientific) thanks to a heated transfer line with the method presented in part 2.1.2.

According to the preliminary results obtained following the sample preparation optimization tests presented part 2.2.1., 1  $\mu\text{L}$  of the additives standard

solutions was introduced in a pyrolysis quartz tube containing a piece of quartz filter. The pyrolysis quartz tube and the quartz filter were both heated beforehand at 1000  $^{\circ}\text{C}$  during 15 seconds to get rid of any residual compounds. Sample tubes were then placed in the pyrolyzer auto-sampler and analysis was performed. Selection of the thermal desorption temperature was carried out on the additives standard solutions by testing three desorption temperatures: 250  $^{\circ}\text{C}$ , 350  $^{\circ}\text{C}$  and 450  $^{\circ}\text{C}$ , with three replicates. The TD time was fixed at 60 seconds based on the litterature, being the most frequently used TD time (Table S1).

To ensure the reliability of the results and the absence of contamination in the analytical device two precautions were taken for each batch: (i) a 1000  $^{\circ}\text{C}$  auto-clean of the pyrolysis chamber during 15 seconds between each analysis; (ii) and five empty pyrolysis quartz tube without sample, hereafter referred as "blank", were pyrolyzed at the beginning of each run.

## 2.3. Application: OPAs identification in food contact materials

### 2.3.1. Sample selection and preparation

Two types of food packaging items made of polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA), coming from two different suppliers, tagged with either A or B, have been selected. The selection of PP was based on its high production and high presence in the marine environment (PlasticEurope, 2020; Zimmermann et al., 2019). The PLA was selected for being the most used bio-based alternative in order to compare its additive content to a petro-based polymer (Geueke et al., 2014).

Punches, *i.e.* cylinders of 1 mm diameter, were cut in the food packaging items using biopsy punches from Farla-Medical (Antwerpen, Belgium), in order to have a homogeneous sample taking process. Thickness of the cylinders was measured using a binocular microscope (Olympus SZX16) and OLYMPYS cellSens Dimention 3.2 software (n=3). The

volumes and the masses ( $\mu\text{g}$ ) of each particle were calculated using the diameters and the thickness measurements. The cylinders were then introduced in pyrolysis sample cups. Sample tubes were placed in the pyrolyzer auto-sampler and analysis was performed ( $n=3$ ).

### 2.3.2. Py/TD-GC-HRMS analyses

In order to thermally desorb the additives contained in the samples, each cylinder was successively analyzed three times at a thermal desorption temperature of  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  to maximize the extraction of the chemicals present in the samples. An approximation of the extraction efficiency percentage (%) was calculated dividing the area recorded at the first step by the total area over the three steps.

All analyses were carried out using the method previously developed and presented part 2.1.2.

The selected OPAs (Table 1) were identified on the basis of the RT, RI, quantitative and qualitative ions and ions ratios with the help of the previously implemented database. The obtained signals were corrected taking in account the procedural blanks, *i.e.*, pyrolysis tubes without sample, the calculated mass of the samples and the extraction efficiency of the method.

## 2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R-Studio software (1.4.1106) (R Core Team). For all the analysis, the normality and the homoscedasticity of the distribution were verified before carrying out ANOVA follow by Tuckey post Hoc test (adding the car package (3.0-12) (Fox et al., 2022)). Assuming that one of the hypothesis was not verified, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. Kruskal Wallis tests were followed by a Nemenyi's post hoc test. Post hoc tests were achieved using agricolae (1.3-5) (De Mendiburu, 2021) and PMCMR (4.4) (Pohlert, 2021) packages. Mean differences were considered as significant when  $p\text{-value} < 0.05$ .

## 3. Results and discussions

### 3.1. Preliminary work and implementation of a HR mass spectra database

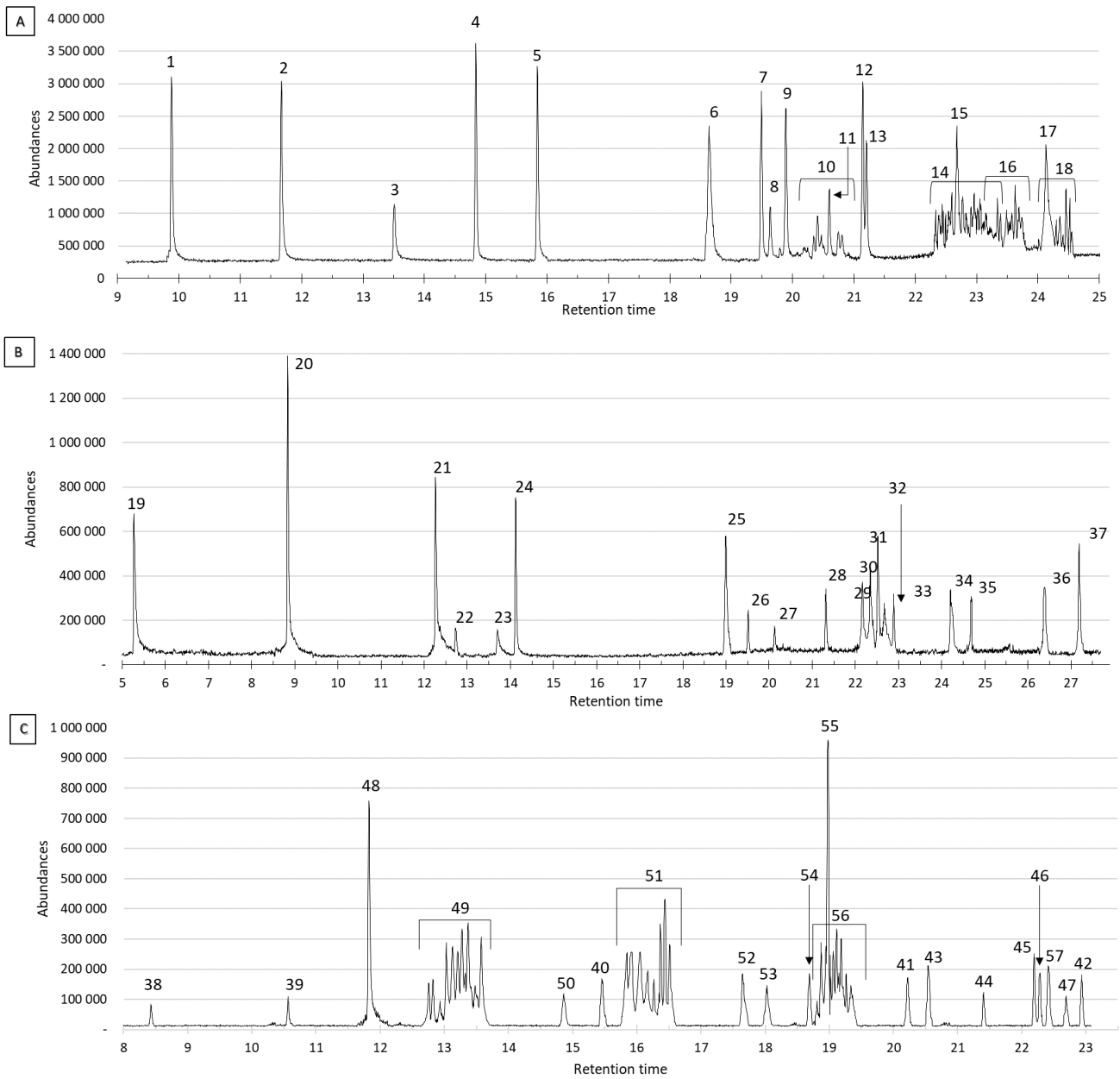
A total of 56 additives were selected as relevant compounds. This selection was based on a

bibliographic work including previous publications, the European Food Safety Authority's (EFSA) list containing their evaluation on substances for FCM and the European chemical agency's (ECHA) additives list containing 400 substances imported in the European Union that are used in plastic products with a trade volume higher than 100 ton/year (Table 1) (Akoueson et al., 2021; Bridson et al., 2021; ECHA, 2019; EFSA, 2009; Fries et al., 2013; Geueke, 2014; Groh et al., 2019; Hahladakis et al., 2018; Maruyama et al., 2015; Wang, 2000a; Wang, 2000b; Wang, 2000c; Yanagisawa et al., 2018). This bibliographic work was performed based on different priority criteria such as: the use of additives in plastic and plastic packaging, a balance between their toxicity and their concentration in polymers, the environment and marine organisms, and finally, the feasibility of GC-MS analysis on these additives.

A standard solution containing all targeted compounds was prepared to set up a suitable GC-HRMS method for their simultaneous analysis. This preliminary work was carried out using GC-HRMS with the method presented part 2.1.2 and allowed the detection of all the selected additives (Figure 1). The spectra of each additives peaks in figure 1 permitted the implementation of our own plastic additives database (Akoueson et al., 2022).

The identification of the additives not already included in NIST database was confirmed by the presence of their respective quantitative and qualitative characteristic ions presented in table 3. An additional confirmation for this set of additives has been made using Kováts RI (Table 3).

In this work, as the analytes were partly selected on their amenability to GC-MS analysis, some additives known to be toxic and widely used in plastic materials (*e.g.* Tetrabromobisphenol A and the hexabromocyclododecane isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -HBCD)) were not targeted. Indeed, depending on their chemical nature, certain OPAs may be complex to analyze and are hard to mobilize (Yanagisawa et al., 2018). These analytical limitations can be overcome with a derivatization step that will modify the sample and product more volatile derivative (Venema and Boom-Van Geest, 1995). It was not employed in the present study, which consisted to implement a fast and easy method. However, using a derivatization approach or leading analysis using liquid extraction could be complementary to have a more complete analysis.



**Figure 1:** Chromatograms of the targeted plastic additives analyzed using GC-HRMS. (A) plasticizers additives; (B) flames retardants additives; and (C) antioxidants, UV stabilizers and plasticizers additives. The numbers refer to the name of the molecules mentioned in Table 1.

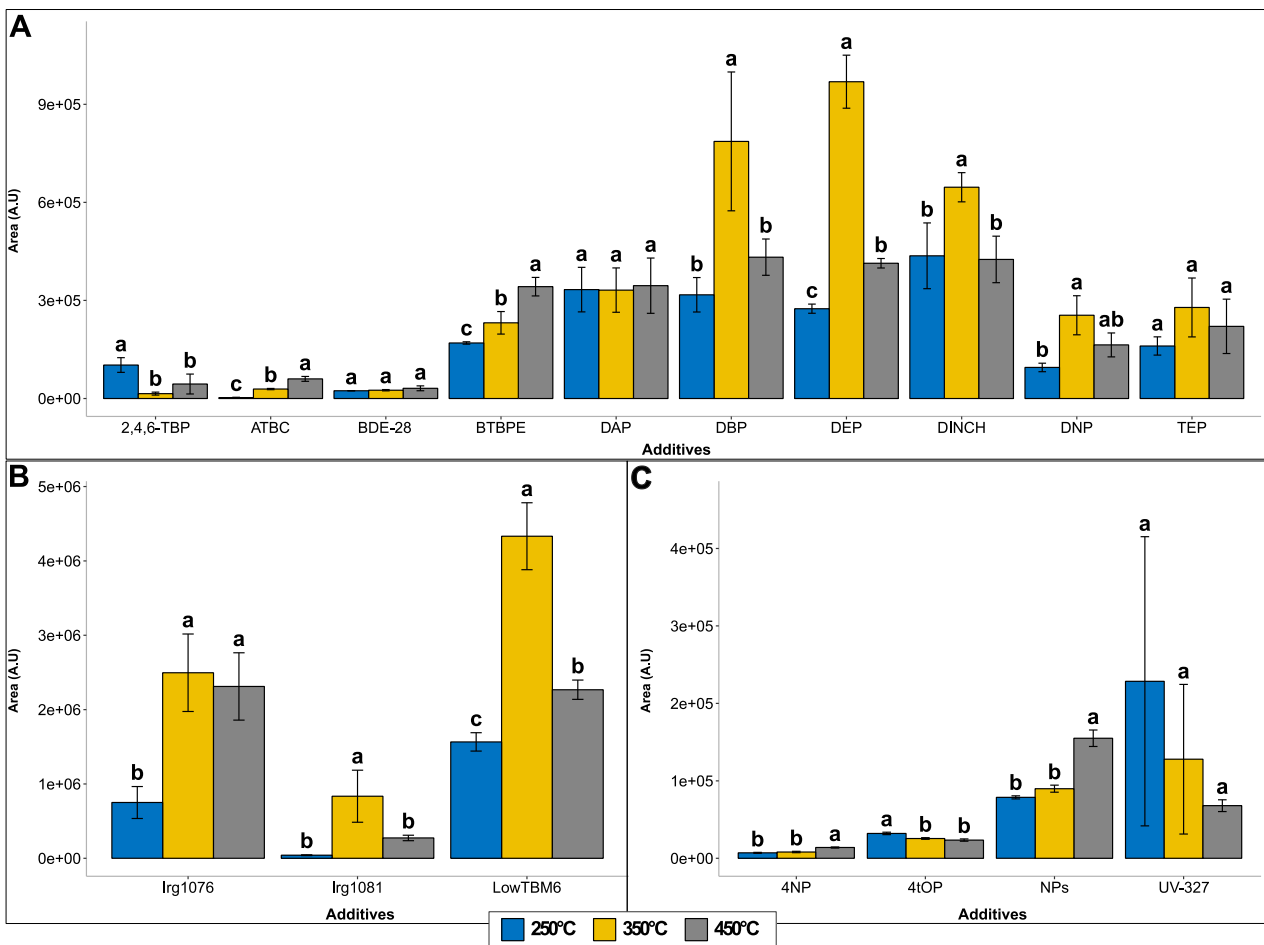


3.2. Optimization and characterization of a Py/TD-GC-HRMS method for the detection of OPAs

Three temperatures were tested at this step: 250°C, 350°C and 450°C. The pyrolyzer thermal desorption temperature had a significant impact on the peaks area of several additives. Figure 2 illustrates the relevant temperature patterns for each additive families. The detailed results for each additive are presented in supplementary data S3.

The areas of most flame-retardants (9 out of 14) showed no significant difference between the three tested temperatures. Areas were significantly higher at 350 °C for three additives (TCEP, TCPP and TDCPP), whereas the area of the 2,4,6-TBP and BTBPE were

significantly higher respectively at 250 °C and 450 °C. The analysis of the plasticizers additives indicates significantly higher areas at 350 °C for 13 additives (BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEP, DHP, DIBP, DIDP, DIHP, DINCH, DNOP, DNP, DOA) out of 16, and at 450 °C for the ATBC. No significant difference has been detected for three additives between the three tested temperatures (DAP, DIHP and DMP). Concerning the antioxidants, areas were significantly higher at 450 °C for six additives (NPs, 4-NP, NP10E, 4NP10E and Irganox 1081®), at 350°C for the Lowinox TBM 8® and at 250 °C for the 4-t-OP. Five additives showed no significant difference between the tested temperatures. Finally, no significant difference was observed for the three UV stabilizers.



**Figure 2:** Peak areas of some selected OPAs depending on the thermal desorption temperature (250 °C, 350 °C and 450 °C, respectively in blue, yellow and grey). (A) plasticizers and flame-retardants; (B) antioxidants; and (C) antioxidants and UV-stabilizers. Values are expressed as mean± 95% confidence interval. Homogeneous groups are indicated by the same letter. (n=3)

Overall, based on these results, 350 °C seems to be the more relevant thermal desorption temperature for the analysis of the selected additives, either being significantly optimal or because no significant differences has been observed between the three temperatures. In line with our results, other studies generally used a thermal desorption temperature of 350 °C (Akoueson et al., 2021; Fries et al., 2013; Kim et al., 2016). Moreover, the temperature is one of the key factors for a successful extraction and subsequent detection (Kim et al., 2016). Indeed, it affects the degree of fragmentation and the generated pyrolysis products, its selection must allow a suitable desorption of the additive without altering it. At too high temperatures, usually above 500 °C, the polymeric matrix begins to degrade and the excess of polymer fragments interfere with the identification of characteristic additive fragments, which make the analysis of the results complicated (Bart, 2001) and may lead to misinterpretation of the results.

The Py/TD-GC-HRMS method was used to analyze 56 additives at various concentration levels (1, 5, 10, 25, 50 and 100 mg.L<sup>-1</sup>). Eight additives, marked with "\*" in the Table 1, were not detected even when the highest concentration was injected in the pyrolyzer. Among them, three phosphorous flame-retardants (TCP, TCrP and TToP), two plasticizers (bisphenol S and TEHPA), two UV stabilizers (Uvinul 3049® and 3008®) and one antioxidant (NP20E). The 49 additives identified have been detected at 5 ng except for the BDEs, the alkylphenols and the Irganox 1081® at 10 ng; for DIDP, DINP, DIHP and the BTBPE at 25 ng; for Lowinox TBM 6® at 50 ng; and for the Irganox 1076® with a detection threshold at 100 ng (Table 1).

A previous study (2000a) mentioned the complicated analysis of phosphorous flame-retardants. Indeed, some analytes are more difficult to analyze than others using Py/TD-GC-HRMS according to their physico-chemical properties (Akoueson et al., 2021). For instance, TEHPA and Uvinul 3008® start to decompose at a temperature of 250°C and 350°C respectively, unlike BPS that has a low volatility and is more thermally stable than its bisphenol's analogs (İyigündoğdu et al., 2020).

Increasing the thermal desorption temperature might help to volatilize the most stable additives, such as the BPS. Nonetheless, the temperatures selected in the study did not permit the desorption of the BPS. Other studies managed to analyze this molecule, for instance Becerra and Odermatt (2012) conducted their analysis with a temperature of 500 °C and added derivatizing agents using trimethyl ammonium hydroxide (TMAH), to increase the volatility of the additive (Becerra and Odermatt, 2012). However, in the present study, it was a thoughtful choice not to derivatize the samples, since the aim was to implement a quick method with minimal sample

preparation steps. Some polymers, such as polystyrene (PS) or polyvinyl chloride (PVC), start to decompose at relatively low temperatures (Bart, 2001). These limitations explain the selection of a method that does not permit the analysis of all additives.

### 3.3. Application of the method on plastic food packaging

#### 3.3.1. Integration of samples mass variability

The masses (µg) of each sample cylinders were calculated using their diameter and thickness as well as the density of each polymer type. The average calculated mass of PP-B, *i.e.* 203 µg, is significantly different (p-value < 0.05) from the three other samples, *i.e.* 338 µg, 317 µg and 276 µg respectively for PP-A, PLA-B and PLA-A. Moreover, a high standard deviation (sd) is noticed especially for PLA-B sample and can be explain by thickness variations according to the location where the sample was cut out on the plastic container (supplementary data S4). In that respect, the respective masses of each analyzed food packaging cylinders were taken into account in order to normalize the additives signal measured in each sample.

#### 3.3.2. Characterization efficiency

The method was developed on additives standard solutions. However, once additives are included in a polymeric matrix, some interactions can occur between the additives and the matrix (Bart, 2001). Hence, the extraction efficiency of the method was directly calculated on the matrices of interest, *i.e.* following the analysis of PP and PLA food packaging samples, in order to take into account the potential interactions.

Each sample were submitted to three successive heating at a thermal desorption temperature of 350 °C. No additive was detected during the third analysis, indicating that the entirety of the additive included in the samples has been desorbed and analyzed during the first or second pyrolysis step (supplementary data S5). Consequently, the sum of the areas obtained during the two first analysis steps is considered as representing 100% of the additives amount included in each sample. The extraction efficiency percentage of each step was therefore calculated based on this assumption.

The results of the extraction efficiency after a first step of desorption were more than 80% for most compounds (Table 4, bold printed characters), with a few exceptions. Five additives required a total of two desorption steps to be fully extracted from the samples, *e.g.* DMP, DEP (for PP samples), DEHA (PP-A), TBP (PLA-A and PP-A) and TCPP, with average extraction efficiency percentages ranging from 50 to 80% or <50% upon the first desorption step (Table 4).

	PLA-A	PLA-B	PP-A	PP-B
<b>DMP</b>	n.d	33 (56)	79 (10)	48 (9)
<b>DEP</b>	<b>90 (17)</b>	<b>95 (9)</b>	70 (4)	65 (9)
<b>DBP</b>	<b>94 (10)</b>	<b>99 (3)</b>	<b>100 (0)</b>	<b>100 (0)</b>
<b>DIBP</b>	<b>98 (3)</b>	<b>98 (3)</b>	<b>100 (0)</b>	<b>100 (0)</b>
<b>DCHP</b>	<b>100 (0)</b>	<b>100 (0)</b>	<b>100 (0)</b>	n.d
<b>DINP</b>	n.d	n.d	<b>87 (2)</b>	<b>88 (4)</b>
<b>DEHA</b>	n.d	<b>90 (18)</b>	59 (36)	<b>93 (2)</b>
<b>TBP</b>	59 (51)	<b>93 (6)</b>	23 (40)	n.d
<b>TCPP</b>	62 (54)	76 (9)	65 (5)	79 (11)
<b>BPB</b>	<b>100 (0)</b>	<b>93 (2)</b>	n.d	n.d

**Table 4:** average extraction efficiency percentages and, in parenthesis, standard deviations of the method following the 1st pyrolysis step, after analyzing the additive content of PLA and PP samples (n=3). Each sample was successively analyzed 3 times at 350 °C. Bold printed characters represent average extraction efficiencies >80%. n.d = not detected.

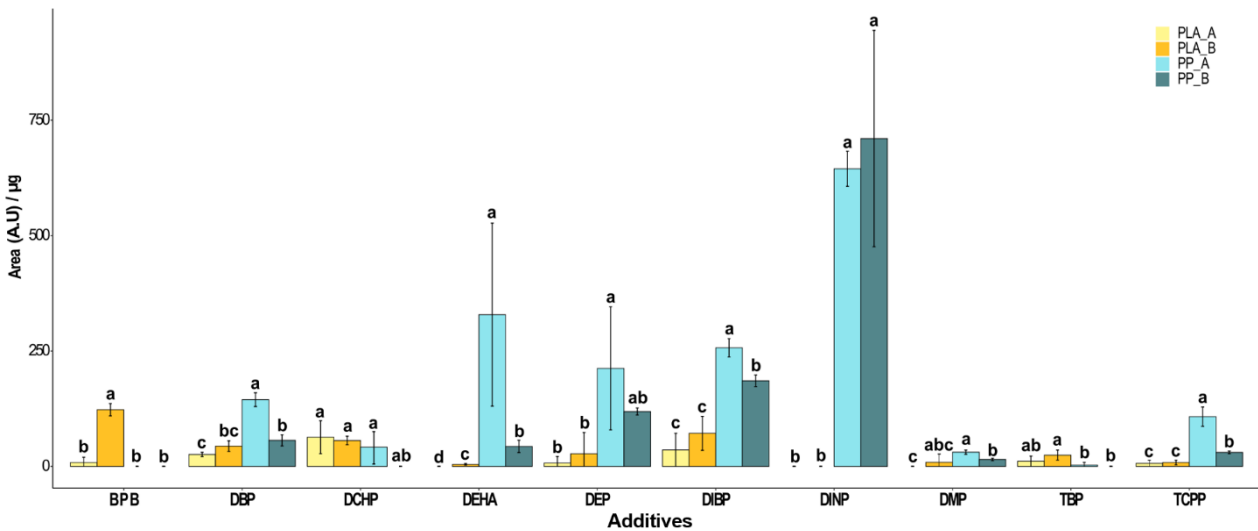
Carrying out two desorption steps doubles the time of the analysis. For this reason, the developed method only includes one thermal desorption step at 350 °C. The average extraction efficiency percentages of each additive for each sample were taken into account in order to correct the additives signal

recorded. However, care must be taken about the completeness of the extraction with this TD method. Although the punch is thin and the cross-section expose the core of the material. It can also be assumed that only the additives on the first layers of the punch could have been desorbed.

3.3.3. Identification of the selected OPAs in PP and PLA food packaging samples

The additives amounts detected in the food packaging samples are expresses in Area (Arbitrary unit (A.U)) per µg of plastic. The values were corrected with the extraction efficiency percentage and the calculated mass of each particle analyzed.

Ten OPAs of interest have been detected in the selected food packaging samples (Figure 3), mostly plasticizers (eight molecules) and flames retardants (two molecules). Two plasticizers, DEP and DIBP and a phosphorous flame retardant, TCPP, have been detected in all samples regardless of the supplier or polymer type. DMP and DBP plasticizers have been identified in all the samples except PLA-A, and DCHP was identified in all the samples except PP-B. Finally, the plasticizer DINP has only been detected in the two PP samples and Bisphenol B exclusively in the two PLA samples. TBP, a phosphorous flame retardant, has been identified both in PP-A and PLA-B only.



**Figure 3:** Corrected peak areas of the OPAs found in the 4 food plastic packaging samples in polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA). The letters A and B referred to the suppliers. Homogeneous groups are indicated by the same letter. (n=3).

The area of DCHP is equivalent among all samples regardless of the supplier or polymer type. Overall, peaks areas for a majority of the OPAs are higher for the PP samples than for the PLA (six out of ten; Figure

3). DBP and DEP peak areas are significantly higher in PP-A samples than in PLA-A and B samples. The areas of DEHA, DIBP, DINP and TCPP in both PP samples are significantly higher than in PLA samples. On the other

hand, the peak area of the phosphorous flame retardant TBP is significantly higher in the PLA-A than in both PP samples.

Looking at the differences between PLA-A and B (Figure 3), the PLA-B contains more additives than the PLA-A. Nine OPAs were identified in the PLA-B, including seven plasticizers (BPB, DBP, DCHP, DEHA, DEP, DIBP and DMP) and two flames retardants (TBP and TCPP), while only seven OPAs were identified in the PLA-A in which the DEHA and DMP have not been detected. In addition, a trend appears that the areas of the OPAs peaks found in PLA-B are mostly higher than those found in the PLA-A, except for the DCHP where the areas are identical. This trend is significant for the Bisphenol B (15 times higher in PLA-B) and the DEHA (absent in the PLA-A while detected in the PLA-B). The same pattern is observed when looking at the PP-A and B samples results (Figure 3). The PP-A contains two additives more than the PP-B. Nine OPAs have been detected in the PP-A, including seven plasticizers (DBP, DCHP, DEHA, DEP, DIBP, DINP and DMP) and two flames retardants (TBP and TCPP), while the PP-B sample only contains seven OPAs (DCHP and TBP missing). The peaks areas of the OPAs identified in the PP-A samples tends to be higher than in the PP-B. It is significant for the DBP (three times higher in PP-A), the DEHA (8x), the DIBP (x1.5), DMP (x2) and TCPP (x4).

However, regarding DEP and DIBP (respectively for PLA and PP, and for PLA only), it is difficult to draw conclusions. Indeed, a large spread in the data can be observed as these additives show a wide 95% confidence interval (IC 95 %). This dispersion can be explained by a lack of homogeneity in the distribution of additives within the same sample. This would then require the multiplication of replicates to be able to take these disparities into account.

These results lead to a few remarks:

First, a petro-based vs bio-based difference. For all analyzed sample, the majority of the OPAs identified were plasticizers. Indeed, during the formulation of plastic materials, OPAs are added at different proportions depending on the polymer and its usage. Most of the time, plasticizers are used extensively, reaching up 60% weight/weight (w/w) (E. L. Teuten et al., 2009). Here, the same number of additives detected in both PLA and PP materials (10 OPAs each) confirms that "bio-based" do not pledge "additives free". Overall, lower amounts (Area (A.U)/mass ( $\mu\text{g}$ )) of additives were noticed in PLA samples (except BPB, DCHP and TBP), while, surprisingly, bisphenol B, a toxic endocrine disruptor analogue of the bisphenol A (Serra et al., 2019), has only been detected in PLA samples. Zimmerman et al., (2019; 2020a) tested the *in-vitro* toxicity and the chemical content of many bio-based materials (PLA items used as FCM). Their study detected priority concern compounds (such as additives, oligomers, along with non-intentional added substances (NIAS))

and highlighted that bio-based materials are not safer than conventional plastics regarding their chemicals content.

Secondly, an inter-suppliers difference. This study underlined non-negligible differences on the identification of OPAs in two food-packaging products manufactured with the same polymer and that are intended to have the same use. That reflects the complexity to generalize and estimate the potentially dangerous additives in the studied material and thus the exposition of marine organisms and consumer, since the chemical composition of a material don't seem to be related to the polymer type but to each individual product. This match the conclusion of Zimmermann et al. (2021) that investigated the toxicity and the chemical composition of several plastic leachates made of conventional in PLA sample including FCM. They ended up with that same conclusion being that the contaminant content and the toxicity cannot be generalized based on the polymer type and are product specific. Plastic products formulation is different depending on the manufacturers, and may explain this difference in additives types and additives abundances between products made with the same polymer. It underlines the need of identifying the chemical content and the chemical safety of each material rather than polymers types, which is not a straightforward task but is inevitable considering the disparity in plastic formulation of the commercially available products. Moreover, the formulation's recipes remain unknown from the scientific community and hinder the evaluation of potential impacts and toxicity of plastic materials.

#### 4. Conclusion

This study was conducted with the aim to set up a suitable Py/TD-GC-HRMS method for simultaneous identification of various selected organic additives and to set up a high-resolution spectral database. The developed method showed its ability to detect the majority of the targeted additives. Nevertheless, this method may be limiting for certain OPAs harder to mobilize using GC. In complement, a liquid extraction analysis would provide more comprehensive results. Ten additives were detected in PP and PLA food contact materials. The results indicate the presence of multiples additives, some of them being toxic, in both petro-based and bio-based food packaging samples (*e.g.* plasticizers, phosphorous flames retardants). Moreover, significant differences were pointed out depending on either the polymer type or the suppliers. The present study highlights the complexity to assess and generalize the additive content and their amount in plastic packaging items due the variety and differences in plastic formulation.

## 5. Declaration of competing interest

Authors do not declare any competing interest.

## 6. Funding

Fleurine Akoueson is very grateful to the Hauts-de-France Regional Council and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) for financially supporting her PhD scholarship. This work was also funded by the European Union (ERDF), the French government, the Hauts-de-France Regional Council and IFREMER, in the framework of the CPER MARCO and IDEAL projects. The funding of CPER MARCO project consists in the acquisition of the Py-GC-HRMS device and consumables used for the experiments.

## 7. CRediT Roles

**F.Akoueson:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **C. Chbib:** Methodology Investigation, Writing - review & editing. **A. Brémard:** Investigation, Formal analysis. **S. Monchy:** Writing - review & editing. **I. Paul-Pont:** Writing - review & editing. **P. Doyen:** Writing - review & editing. **A. Dehaut:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing - review & editing. **G. Duflos:** Resources, Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

## 8. References

Les références sont listées page 184 du présent manuscrit.

## 9. Supplementary files

**S1: selection of some GC-MS or Py-GC-MS methods parameters for the analysis of organic plastic additives**

Ref.	Additives	Py T° (°C)	Py time (sec)	GC-MS oven program	Ion source T° (°C)	Transfer line T° (°C)	Injection T° (°C)	Split	Scan Range (amu)	Vent flow (mL/min)	Column
(Bolgar et al., 2016)	phthalates; Lowinox TBM 6 ; Irganox® 1076 ; ATBC; BTBPE; TEP; UV 326; UV 327	none	none	50 °C (0 min) → 15 °C/min → 330 °C (20 min)	n.a	n.a	250	n.a	n.a	n.a	n.a
(Zhang, 2019)	phthalates	none	none	60 °C (1.5 min) → 20 °C/min → 220 °C (1 min) → 5 °C/min → 280 °C (4 min)	320	280	280	splitless	n.a	1.2	HP-5MS 30m x 0.25 mm x 0.25µm
(Galmán Graíño et al., 2018)	phthalates, ATBC, DEHA	none	none	40 °C (2min) → 9 °C/min → 300 °C (3min)	300	300	300	splitless		1	ZB-5MS 30m x 0.25 mm x 0.25µm
(Restek)	TCP; TBP	none	none	100 °C → 10 °C/min → 180 °C (2 min) → 18 °C/min → 300 °C (3 min)	n.a	n.a	250	splitless	n.a	n.a	Rtx-35 30m x 0.25 mm x 0.25µm
(Restek, 2017)	2,4,6 TBP	none	none	70 °C (1 min) → 28 °C/min → 285 °C → 3 °C/min → 305 °C → 30 °C/min → 320 °C (1 min)	270	280	270	splitless	35 - 550	1.2	Rxi-5SilMS 30m x 0.25 mm x 0.25µm
(Wang, 2000c)	ATBC ; ThPP ; DOA	375	20	40°C (4 min) → 10°C/min → 320°C (18 min)	n.a	n.a	300	30	15 - 650	n.a	J & W Scientific DB-5 30m x 0.25mm x 1µm
(Kim et al., 2016)	phthalates	340	60	40°C (1 min) → 50°C/min → 200°C → 15°C/min → 300°C (5 min)	230	300	300	50	50 - 500	1	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05µm
(Riess et al., 2000)	phthalates ; DINCH, BFRs	350	n.a	80 °C → 10 °C/min → 320 °C	n.a	300	n.a	50	50 - 500	50	Ultra Alloy Phthalates 30m x 0.25mm x 0.05µm
(Maruyama et al., 2015)	phthalates	340	60	80 °C → 20 °C /min → 300 °C (5min)	230	n.a	320	50	50 - 500	52.1 cm/s	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05µm
(Randle et al., 2013)	phthalates ; DOA	320	n.a	(1) 80 °C (1min) → 50 °C/min → 200 °C → 15 °C/min → 350 °C (2min) (2) 40 °C → 40 °C/min → 200 °C → 5 °C/min → 300 °C (1min) → 20 °C/min → 320 °C (2.5min)	230	300	300	20	29 - 600	1.3	Ultra ALLOY-5 30m x 0.25mm x 0.25µm
(Yanagisawa et al., 2019)	phthalates ; BFRs ; PFRs	340	60	80 °C → 20 °C/min → 300 °C (5min)	230	300	320	50	50 - 1000	52.1 cm/s	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
(Fries et al., 2013)	phthalates	350	60	40°C → 10 °C/min → 350 °C (10min)	n.a	350	n.a	splitless	10-600	60	HP-5MS 30m x 250µm x 0.25µm

Chapitre 2 : Identification d'additifs plastiques par Py/TD-GC-HRMS

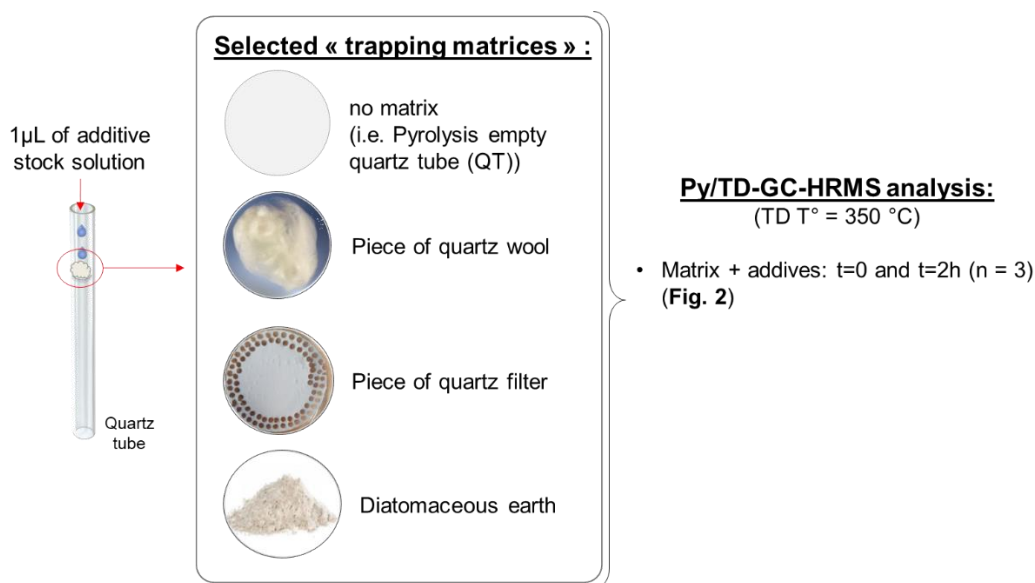
Ref.	Additives	Py T° (°C)	Py time (sec)	GC-MS oven program	Ion source T° (°C)	Transfer line T° (°C)	Injection T° (°C)	Split	Scan Range (amu)	Vent flow (mL/min)	Column
(IEC, 2017)	phthalates	340	60	80 °C → 20 °C /min → 300 °C (5 min)	230	300	300	50	50 - 1000	1.5	Type of column: n.a 30m x 0.25 mm x 0.25µm
(Kudo et al., 2019)	phthalates	340	60	80 °C → 20 °C/min → 300 °C (5min)	230	300	300	50	50 - 1000	52.1 cm/s	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25mm x 0.05 µm
(Herrera et al., 2003)	nonylphenols	300	150	60 °C → 5 °C/min → 90 °C (1.5min) → 10 °C/min → 300 °C (10min)	n.a	300	280	n.a	SIM	1.5	UA5-30M-0.25F Frontier Lab 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm
(Yanagisawa et al., 2018)	phthalates, PBDEs	340	60	80 °C → 20 °C/min → 300 °C (5min)	230	300	320	50	50 - 1000	52.1 cm/s	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
(Sitholé and Pimentel, 2009)	nonylphenols	650	20	50 °C (2min) → 8 °C/min → 310 °C (0.5min)	250	300	300	25	50 - 650	1.6	DB5-HAT 30m x 0.25mmx0.10µm
(Hosaka et al., 2005)	PBDEs	320	60	40 °C → 20 °C/min → 320 °C	300	300	300	20	n.a	1	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm
(Yuzawa et al., 2008)	PBDEs	340	60	80°C → 20 °C /min → 320 °C (3min)	300	300	300	20	n.a	1	Ultra ALLOY-PBDE 15m x 0.25 mm x 0.05µm

n.a: not available

**S2: Additional result concerning the selection of the solution trapping matrix for the OPAs analysis using Py-GC-HRMS (cf. Part 2.2.1. of the main article).**

In order to ease the analytical process and to reduce the high volatility of several additives, four sample preparations were tested (Fig. 1) on different families of additives (*i.e.* 11 phthalates, 7 phosphorous flame-retardants and 6 antioxidants).

One  $\mu\text{L}$  of the additives stock solutions at concentrations ranging from 5 to 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , were either added into an empty pyrolysis quartz tube (QT) or into a pyrolysis QT containing three types of different materials used as "solution trapping matrix". The selected matrix were a piece of quartz filter, a piece of quartz wool or a small amount of diatomaceous earth (silicium dioxide). (Fig. 1)



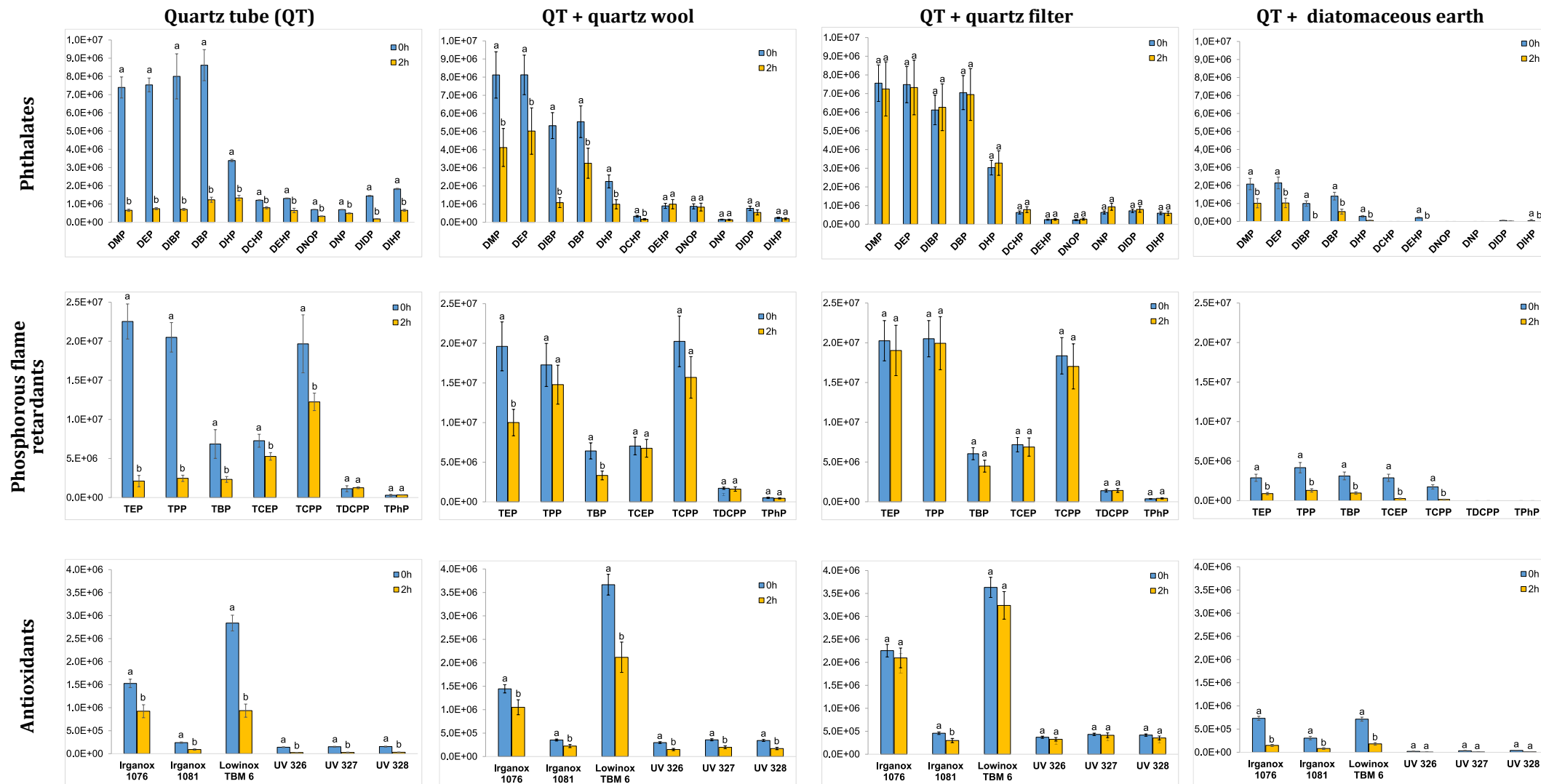
**S2 - Figure 1:** schematic view of the protocol for the selection of an appropriate "trapping matrix" for the analysis of OPAs using Py-GC-HRMS.

For each additives tested, six pyrolysis QT of each conditions (*i.e.* an empty pyrolysis QT, or a QT containing a piece of quartz filter, a piece of quartz wool or a small amount of diatom sand) were prepared. In order to verify the limitation of evaporation of the analytes added onto the trapping matrices, a batch of three tubes (n = 3) was analyzed directly at a TD T° of 350 °C and using the GC-HRMS method presented in the main article. The three others remaining tubes were analyzed after two hours of waiting time (n = 3) (Fig. 2). Figure 2 shows the selection of the most suitable matrix (*i.e.* the quartz filter which limited the decrease of the majority of additives area with the waiting time).

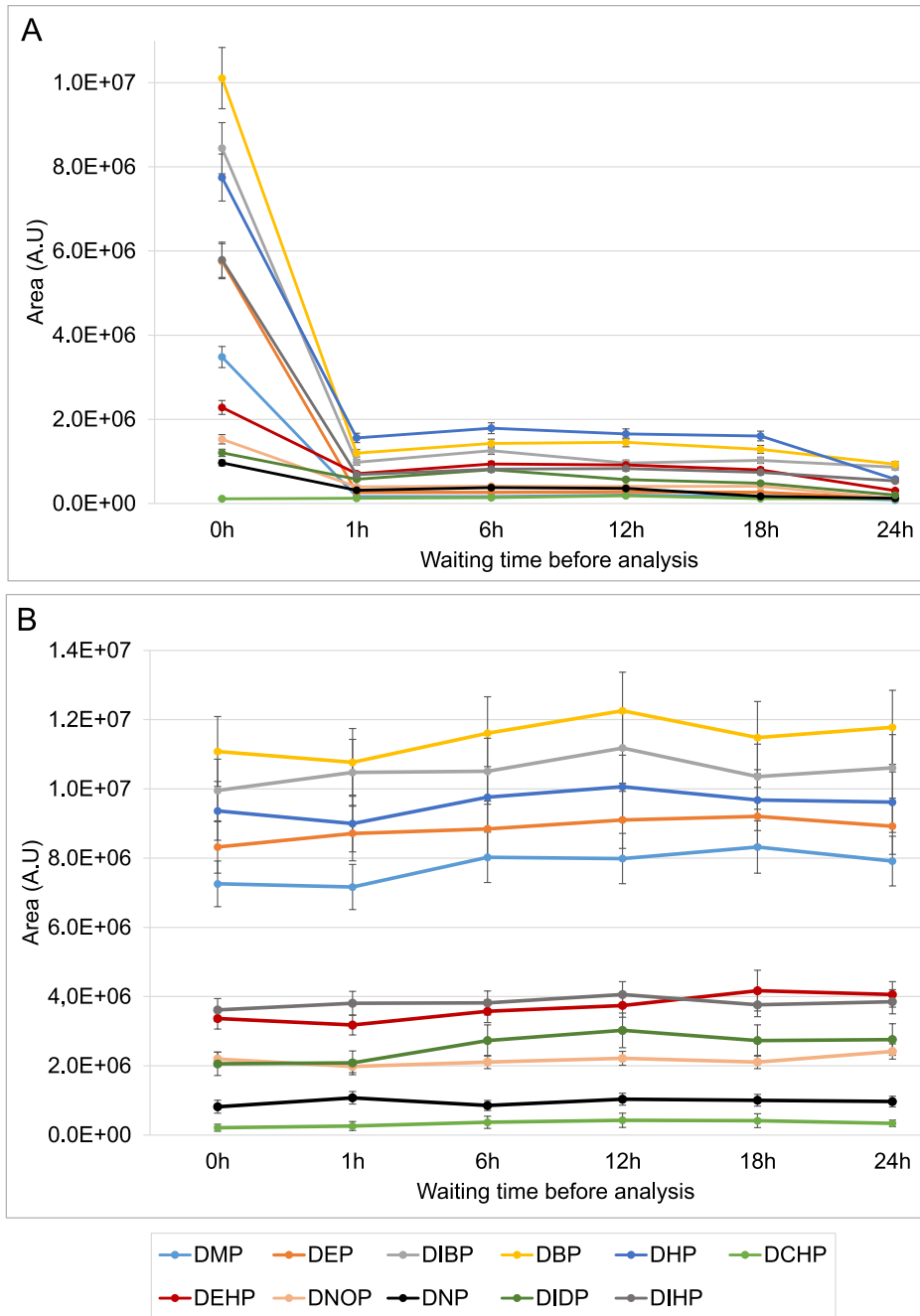
Finally, To ease the analytical process and the sample preparation, a longer waiting time (up to 24h) was tested on the selected trapping matrix (*i.e.* quartz filter) for some of the most volatile analytes (*i.e.* phthalates) (Fig. 3). Figure 3-B shows that the compounds are stable on the selected matrix for the whole period of the analysis.

Hence, considering these results, the quartz filter was chosen as a suitable « trapping matrix » since it permit to stabilize the compounds despite the waiting time between the sample preparation and the analysis.



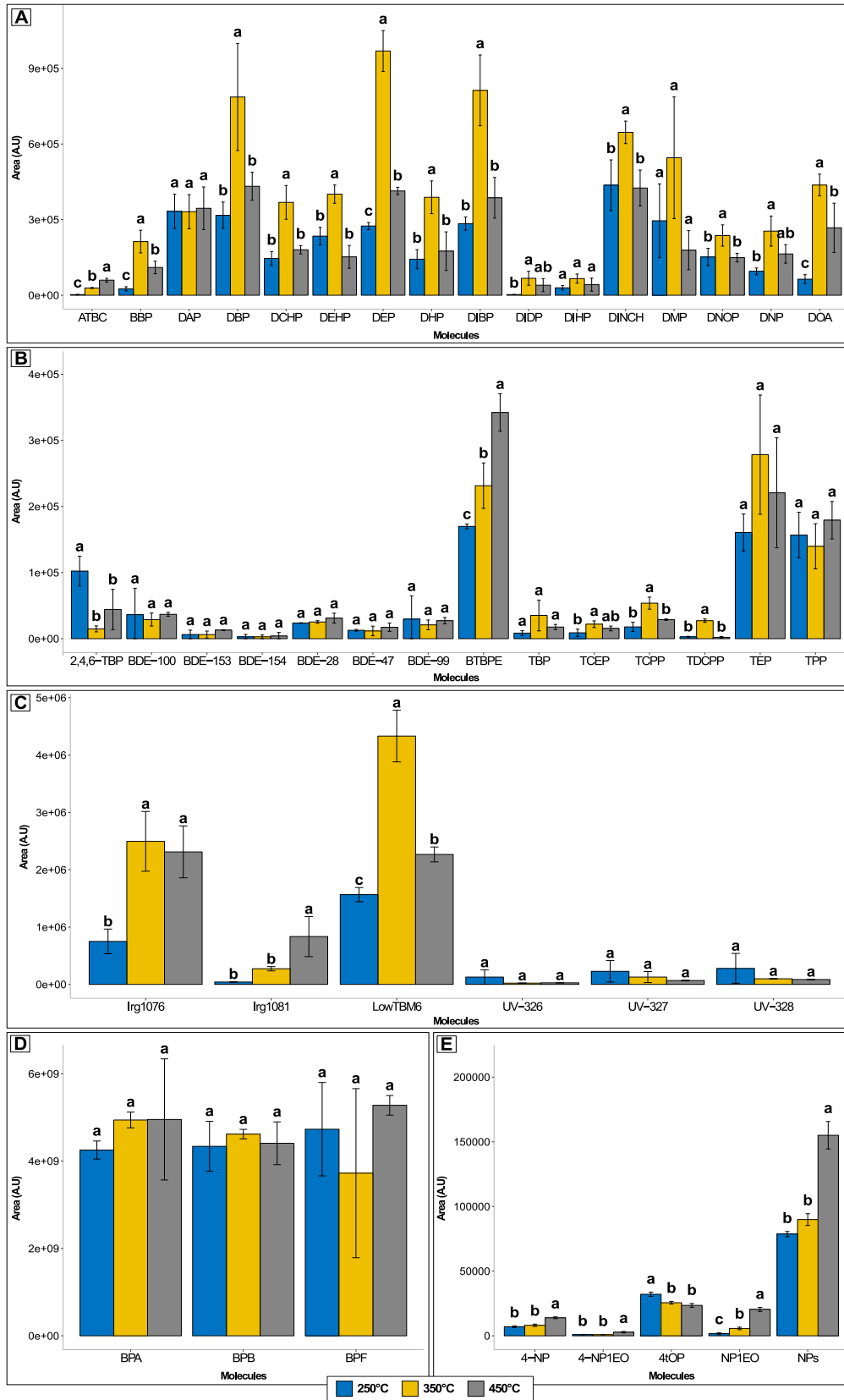


S2 - Figure 2: OPAs peak areas after addition of the additives stock solutions of some molecules of phtalates (from 5 to 25 mg/L), phosphorous flames retardants (at 5 mg/L) and antioxidants (from 5 to 100 mg/L), according to the conditions: *i.e.* no matrix addition = Quartz tube (QT), Quartz wool, Quartz filter, and Diatomaceous earth. The solutions were added directly after sample preparation (t=0), or after 2h of waiting time (t=2h) (n=3). Homogeneous groups are indicated by the same letter.

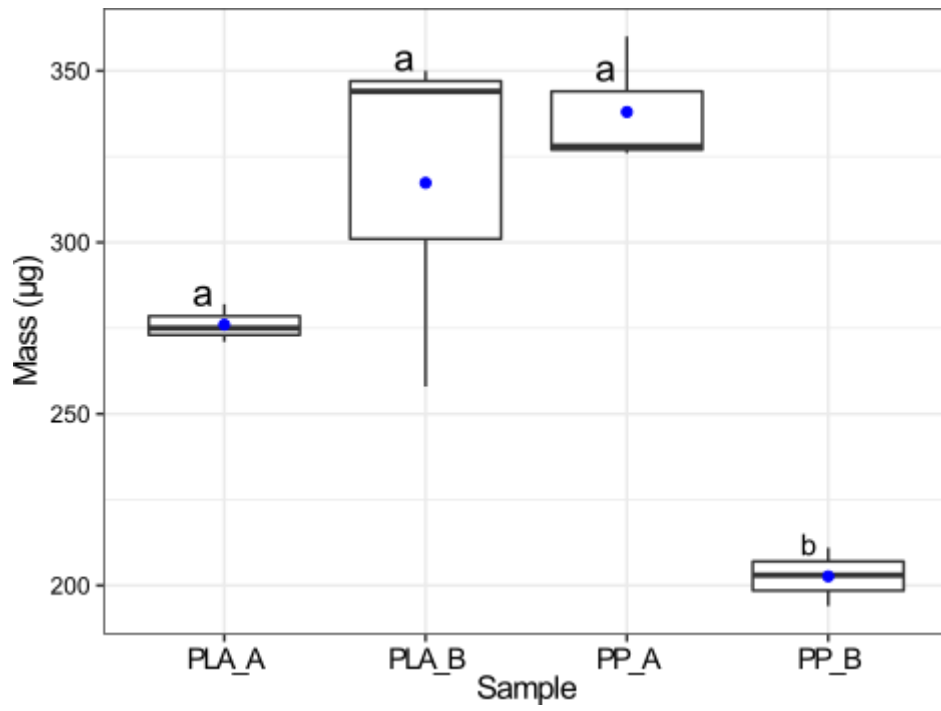


**S2 - Figure 3:** OPAs peak areas evolution according to the waiting time (*i.e.* 0, 1h, 6h, 12h, 18h and 24h) after the addition of the phthalates additives stock solution (from 5 to 25 mg/L), into (A) the empty pyrolysis quartz tube and (B) the quartz tube containing a piece of quartz filter (n=3).

**S3: Peak areas of the selected OPAs depending on the thermal desorption pyrolysis temperature (250 °C, 350 °C and 450 °C, respectively in blue, yellow and grey) for (A) plasticizers; (B) flames retardants; (C) Antioxidants and UV-stabilizers; (D) and (E) Antioxidants, plasticizers and stabilizers. Homogeneous groups are indicated by the same letter.**



S4: Calculated masses of the analyzed PP and PLA samples. The blue dots represent the mean. Homogeneous groups are indicated by the same letter (n=3).



**S5: Extraction recoveries percentages (R) of the method following the first pyrolysis step, after analyzing the additive content of PLA and PP samples (n=3). Each sample was successively analyzed 3 times at 350°C (shots 1, 2 and 3). n.d = not detected.**

		PLA-A-1	PLA-A-2	PLA-A-3	PLA-B-1	PLA-B-2	PLA-B-3	PP-A-1	PP-A-2	PP-A-3	PP-B-1	PP-B-2	PP-B-3
<b>DMP</b>	R (%) shot 1	n.d	n.d	n.d	98	n.d	n.d	70	77	89	44	58	43
	R (%) shot 2	n.d	n.d	n.d	2	n.d	n.d	30	23	11	56	42	57
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DEP</b>	R (%) shot 1	100	100	71	100	100	85	73	72	65	61	69	63
	R (%) shot 2	n.d	n.d	29	n.d	n.d	15	27	28	35	39	31	37
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>TRP</b>	R (%) shot 1	n.d	82	95	100	89	89	n.d	n.d	70	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 2	n.d	18	5	n.d	11	11	n.d	n.d	30	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>TCP</b>	R (%) shot 1	n.d	85	100	66	80	83	60	70	67	71	75	92
	R (%) shot 2	n.d	15	n.d	34	20	17	40	30	33	29	25	8
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DIBP</b>	R (%) shot 1	100	100	95	100	100	95	100	100	100	100	100	100
	R (%) shot 2	n.d	n.d	5	n.d	n.d	5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DBP</b>	R (%) shot 1	100	100	82	100	100	96	100	100	100	100	100	100
	R (%) shot 2	n.d	n.d	18	n.d	n.d	4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>BPB</b>	R (%) shot 1	100	100	100	94	91	93	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 2	n.d	n.d	n.d	6	9	7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DEHA</b>	R (%) shot 1	n.d	n.d	n.d	100	100	69	34	100	41	91	95	92
	R (%) shot 2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	31	66	n.d	59	9	5	8
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DCHP</b>	R (%) shot 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>DINP</b>	R (%) shot 1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	87	89	85	84	90	92
	R (%) shot 2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	13	11	15	16	10	8
	R (%) shot 3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

## 2.2. Résultats complémentaires : Application de la méthode analytique sur des échantillons en PE et en PP, dans le cadre d'une contribution dans une étude d'exposition de moules à des lixiviats de ces matériaux.

La méthode développée et présentée dans la partie 2.1. a été appliquée sur des échantillons de granulés commerciaux en PP et PE, dans le cadre d'une collaboration avec le LOG (Wimereux, France). Ces analyses ont été réalisées pour identifier, à l'aide de la base de donnée HR créée, des APOs dans leurs échantillons en PP et PE à partir desquels des lixiviats ont été préparés afin d'étudier l'impact potentiel de ces lixiviats sur le comportement de la moule (*M. edulis*).

Une partie des résultats obtenus a été valorisée dans l'article scientifique de Uguen et al. (2022) publié dans le journal *Chemosphere* et disponible en Annexe 2. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

### 2.2.1. Méthodologie utilisée pour l'analyse des APOs dans les échantillons de PP et de PE

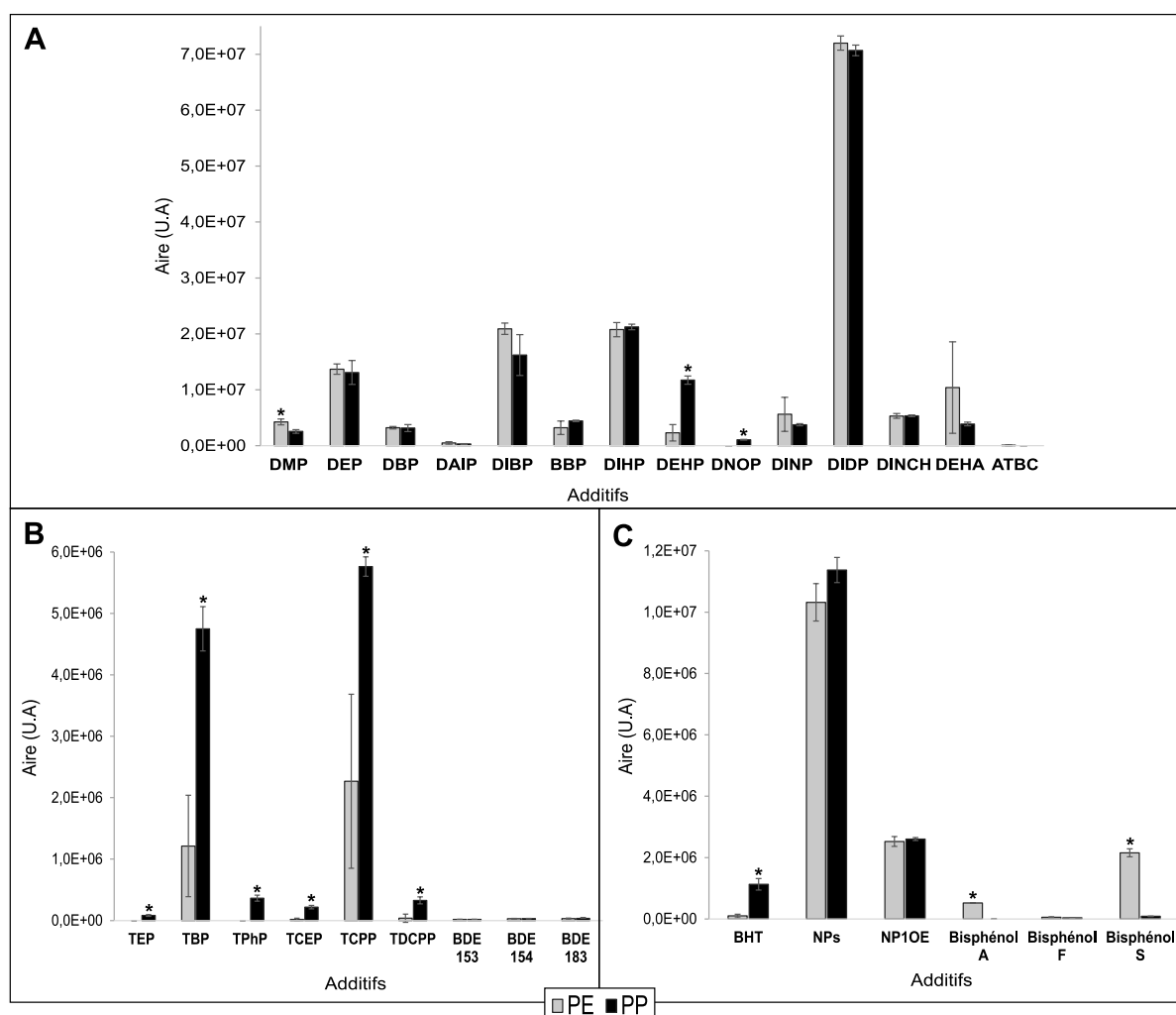
Afin de garantir la fiabilité des résultats et l'absence de contamination du dispositif d'analyse, deux précautions ont été prises : (i) un auto-nettoyage de la chambre de pyrolyse à 1000 °C pendant 15 secondes entre chaque analyse ; (ii) cinq tubes de pyrolyse en quartz vides, *i.e.* Blancs d'analyses, ont été analysés avec la même méthode au début de chaque run d'analyse.

Deux types d'échantillons, en provenance du LOG, ont été reçus : des granulés de PP et de PE, de 3,3 à 4,7 mm de diamètre, achetées à Pemmiproducs Aachen (Allemagne). Ces granulés ont été découpés avec un scalpel sous une loupe binoculaire (Olympus SZX16), pour obtenir des fragments d'environ 500  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 16 \mu\text{m}^2$ ). Ces fragments ont directement été placés dans un tube de pyrolyse en quartz et ont été analysés en triplicata avec la méthode développée en Py/TD-GC-HRMS et présentée dans la partie précédente. Les signaux obtenus ont été corrigés en tenant compte des blancs d'analyses, *i.e.* tubes de pyrolyse sans échantillon.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel 5-studio (1.4.1106) (R Core Team). Pour chaque additif, les différences entre les échantillons de PP et PE ont été testées avec un test T de Student après vérification de la normalité des données et de l'égalité des variances. Les résultats sont exprimés en : moyenne  $\pm$  intervalle de confiance à 65%. Le seuil de significativité considéré est  $\alpha=5\%$ .

### 2.2.2. Synthèse des résultats et discussions

L'analyse des échantillons de PE et PP a permis d'identifier 29 additifs pour l'ensemble des échantillons, dont 14 plastifiants, 9 retardateurs de flamme et 6 antioxydants (**Figure 9**). 28 additifs ont été identifiés dans le PP et 26 dans le PE. Seules quelques différences ont été observées entre les deux polymères. Trois additifs (le DNOP, le TEP et le TPhP), ont uniquement été identifiés dans le PP, et une molécule (le bisphénol A) a uniquement été identifiée dans le PE. De plus, les aires des additifs relevées pour le PP sont supérieures au PE pour neuf molécules : le DEHP, le DNOP (Figure 9 - A), toutes les molécules de retardateurs de flamme phosphorés (Figure 9 - B) et pour le BHT (Figure 9 - C). En revanche, les aires du DMP et des bisphénols A et S sont supérieures dans le PE en comparaison avec le PP. De plus, très peu de variabilité entre les répétitions d'un même échantillon est observée.



**Figure 9 : Aires (en unité arbitraires (U.A)) des additifs plastiques organiques (APOs), (A) plastifiants, (B) retardateurs de flamme, et (C) antioxydants, identifiés dans les deux échantillons de PE (gris) et de PP (noir), après l'analyse de particules de 500  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 16 \mu\text{m}^2$ ) (n=3). \* : différence significative entre les échantillons de PE et de PP (Test T de Student, p<0,05).**

Suite aux expérimentations effectuées dans l'étude de (Uguen et al., 2022) (Article 3 – Annexe 2), seules les expérimentations correspondantes aux lixiviats de PP ont été valorisées. Les résultats ont montré que l'exposition des moules aux lixiviats de PP a modifié leurs réponses comportementales en altérant leur motilité face à différents stimulus chimiques, dont un mimant la présence d'un prédateur. La présence d'additifs toxiques (*e.g.* bisphénol, phtalates, PBDEs, TCEP) dans la matière première, ayant potentiellement lixiviés dans l'eau de mer (EDM), *i.e.* le milieu d'exposition, pourrait en être la cause. Cependant, aucune caractérisation chimique des lixiviats n'a été effectuée dans cette étude, ce qui ne permet pas d'identifier les molécules potentiellement désorbés et bio disponibles pour les moules.



### 3. Contribution de ces travaux

Suite à la sélection de 56 additifs d'intérêt, diverses recherches et optimisations méthodologiques ont permis de mettre en place une méthode globale en Py/TD-GC-HRMS pour l'analyse d'APOs.

L'étape de sélection de la température de thermodésorption a permis de retenir 350 °C comme température optimale pour l'ensemble des additifs d'intérêt. La méthode finale en Py/TD-GC-HRMS, accompagnée de la base de données haute résolution créée, permet l'identification de 49 APOs (sur 56 sélectionnés) de différentes classes et propriétés permettant ainsi de cibler une vaste gamme d'additifs.

Suite à l'application de cette méthode sur divers échantillons (*i.e.* barquettes alimentaires en PP et PLA et des granulés commerciaux de PP et PE) de tailles et formes variés, différents APOs, dont certains reconnus comme étant toxiques, ont pu être identifiés avec succès après une préparation simple des échantillons (découpage des échantillons en particules de tailles  $\leq 1$ mm de diamètre de façon à pouvoir les insérer dans le tube de pyrolyse en quartz).

En l'absence de matériaux de références à notre disposition et de méthode quantitative, l'efficacité de l'extraction de la méthode développée en Py/TD-GC-HRMS a été estimée directement sur les matrices d'intérêt, c'est-à-dire après l'analyse des échantillons d'emballages alimentaires. D'après les calculs réalisés dans cette étude, la méthode développée a permis une extraction totale ou supérieure à 80% pour la majorité des APOs analysées. Seuls cinq additifs nécessitaient une seconde étape d'extraction pour être intégralement extraits. De ce fait, pour ces composés, si une seule étape de TD est effectuée, un facteur de correction devra être appliqué.

L'analyse des APOs présents dans les barquettes alimentaires ont permis de mettre en évidence :

- La présence de dix APOs (plastifiants, retardateurs de flamme phosphorés et antioxydants) dans l'ensemble des échantillons en PP et PLA, dont certains additifs (phtalates et bisphénol B) catégorisés comme dangereux pour l'Homme.
- Un nombre équivalent d'additifs entre les polymères pétro- et biosourcés (PP et PLA).
- Une différence de signature chimique entre les polymères, sur l'identité des additifs et l'intensité du signal avec des aires globalement plus élevées pour les barquettes en PP.
- Une différence de signature chimique entre les fournisseurs pour un polymère donné soulignant que l'identité chimique d'un échantillon n'est pas relative au polymère mais dépend plutôt de chaque produit.
- Une variabilité du signal entre les répliques d'un même échantillon, indiquant potentiellement une hétérogénéité dans la répartition des additifs au sein du matériau.

Dans le cadre d'une seconde étude, la méthode développée a pu être appliquée sur des échantillons de PE et PP commerciaux et a permis d'identifier un total de 29 additifs, *i.e.* 26 et 28 additifs respectivement dans le PE et le PP, avec quelques rares différences sur l'identité des additifs et sur l'intensité du signal selon les composés.

Les résultats de l'article correspondant, *i.e.* (Uguen et al., 2022), ont montré un effet des lixiviats issus de ces granulés de PP sur le comportement des moules.

Dans la même logique, au vu de la présence de certains APOs toxiques dans les échantillons de barquettes alimentaires en PP et PLA, nous nous sommes questionnés sur la toxicité ces échantillons pour différents modèles biologiques.



# **CHAPITRE 3**

---

## **Lixiviation des additifs : caractérisation chimique et études écotoxicologiques**

## **Chapitre 3 : Lixiviation des additifs et études d'écotoxicités**

### **1. Préambule**

Différentes études ont investigué la toxicité de lixiviats pour différents types de plastiques et sur divers organismes mais seules quelques-unes d'entre elles ont étudié en parallèle la composition chimique des lixiviats pour tenter de faire un lien avec la toxicité observée (Gardon et al., 2020; K. Tallec et al., 2022; Zimmermann et al., 2021; Zimmermann et al., 2020a; Zimmermann et al., 2020b). De même, la caractérisation chimique et la toxicité de lixiviats de MCDA restent largement sous-étudiées. Pourtant, ces matériaux font partie de la classe de déchets la plus retrouvée dans le milieu marin (OSPAR, 2018), qu'ils soient de nature pétrochimique ou biosourcée comme le PLA, qui est la première alternative aux produits pétrosourcés pour les MCDA (Jabeen et al., 2015).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail était d'étudier la composition de lixiviats d'échantillons de barquettes alimentaires en PP et PLA et leur toxicité via des bioessais normés et/ou adaptés lors de précédentes études (Tallec et al., 2018).

Dans un premier temps, des lixiviats de barquettes en PP et PLA, précédemment analysés par Py-GC/MS (Chapitre 2), préparés dans de l'eau de mer (EDM) naturelle filtrée, ont été analysés par GC-MS/MS après extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE). Dans le même temps, les matériaux bruts ont aussi été analysés par lavage au solvant (méthanol) afin de déterminer leur composition en APOs avec la même méthode analytique.

Dans un second temps, afin d'appréhender la toxicité de ces lixiviats, trois bioessais ont été réalisés en dose-réponse :

- Un test de toxicité aigüe, *i.e.* Test Microtox® B-Tox, sur *Aliivibrio fischeri*, qui est rapide, facilement reproductible, et sensible concernant la détection de toxicité non spécifique (Neale et al., 2012).
- Deux bioessais adaptés sur les jeunes stades de vie de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), à savoir les gamètes et les embryons. Le modèle huître a été choisi pour son importance environnementale (*i.e.* espèce sentinelle) et socioéconomique (FAO, 2020b).

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (Cedre) pour la première partie de la caractérisation chimique et la réalisation du test Test Microtox® B-Tox. Les tests de fécondation et embryo-larvaire sur l'huître ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de l'environnement marin (LEMAR).

L'utilisation d'une approche pluridisciplinaire permettra de discuter de la propension des additifs à être relargués en conditions réalistes, de leur potentielle biodisponibilité et de la complémentarité des approches en chimie analytique et biologie dans l'évaluation du risque chimique lié aux débris plastiques.

Dans une dernière partie, la comparaison des deux jeux de données obtenus sur les barquettes en PP et PLA (Py-GC/MS matière brute ; SBSE-GC-MS/MS matière brute) permettra de discuter de la sensibilité et de la complémentarité des méthodes analytiques utilisées pour l'identification d'OPAs.

## 2. Etude de la composition et de la toxicité de lixiviats de matériaux plastiques

### 2.1. Présence et impacts d'additifs plastiques dans des contenants alimentaires en PP et PLA : complémentarité des analyses chimiques et des bioessais pour l'évaluation du risque.

Les résultats de cette partie ont été valorisés par la rédaction d'un article scientifique, publié dans le journal *Science of the total environment* (**Article 4**) (doi : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159318>). Cet article sera présenté dans les pages suivantes.

#### 2.1.1. Objectif de l'étude et démarche expérimentale

Cette étude vise à investiguer le profil chimique et écotoxicologique de quatre échantillons de barquettes alimentaires en PP et en PLA, chacune provenant de deux fournisseurs différenciés par les lettres A et B (**Figure 10**).

L'étude du profil chimique a été effectuée sur les matériaux bruts, après un lavage au méthanol, et sur des lixiviats des matériaux après cinq jours de lixiviation dans de l'EDM. Les analyses de quantification des additifs ont été effectuées par le CEDRE par SBSE-GC-MS/MS en ciblant 56 molécules d'APOs (Chapitre 2).

Par la suite, l'étude du profil toxicologique a été réalisée sur les lixiviats EDM des échantillons de barquettes alimentaires via l'établissement de trois bioessais normés et sensibles :

#### (i) Le test Microtox® B-Tox sur (*Aliivibrio fischeri*)

La toxicité des lixiviats EDM a été estimée par la mesure d'inhibition de bioluminescence des bactéries *A. fisheri* après qu'elles aient été exposées à la solution de lixiviats la plus concentrée, *i.e.* 2000 mg.L<sup>-1</sup>. Les tests sur les concentrations plus faibles ont été réservés en cas de toxicité avérée aux concentrations plus élevées.

#### (ii) Le test sur la fécondation de l'huître creuse (*C. gigas*)

La toxicité des lixiviats EDM sur le succès de fécondation de l'huître a été réalisé en exposant des gamètes d'huîtres (ovocytes et spermatozoïdes) aux lixiviats de concentrations allant de 0,2 à 200 mg.L<sup>-1</sup>. Le succès de fécondation a été estimé en comparant leur taux d'ovocytes fécondés de chaque condition d'exposition avec le taux d'ovocytes fécondés dans les témoins d'EDM.

#### (iii) Le test sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*)

La toxicité des lixiviats EDM sur le développement embryonnaire de l'huître a été réalisé en exposant des embryons d'huîtres (1h30 post-fécondation) aux lixiviats EDM de concentrations allant

de 0,2 à 2000 mg.L<sup>-1</sup>. La toxicité des lixiviats a été estimée en comparant le taux de larves D<sup>10</sup> viables sans anomalies (*i.e.* arrêt de développement ou malformations) avec le taux de larves D viables dans les témoins d'EDM).

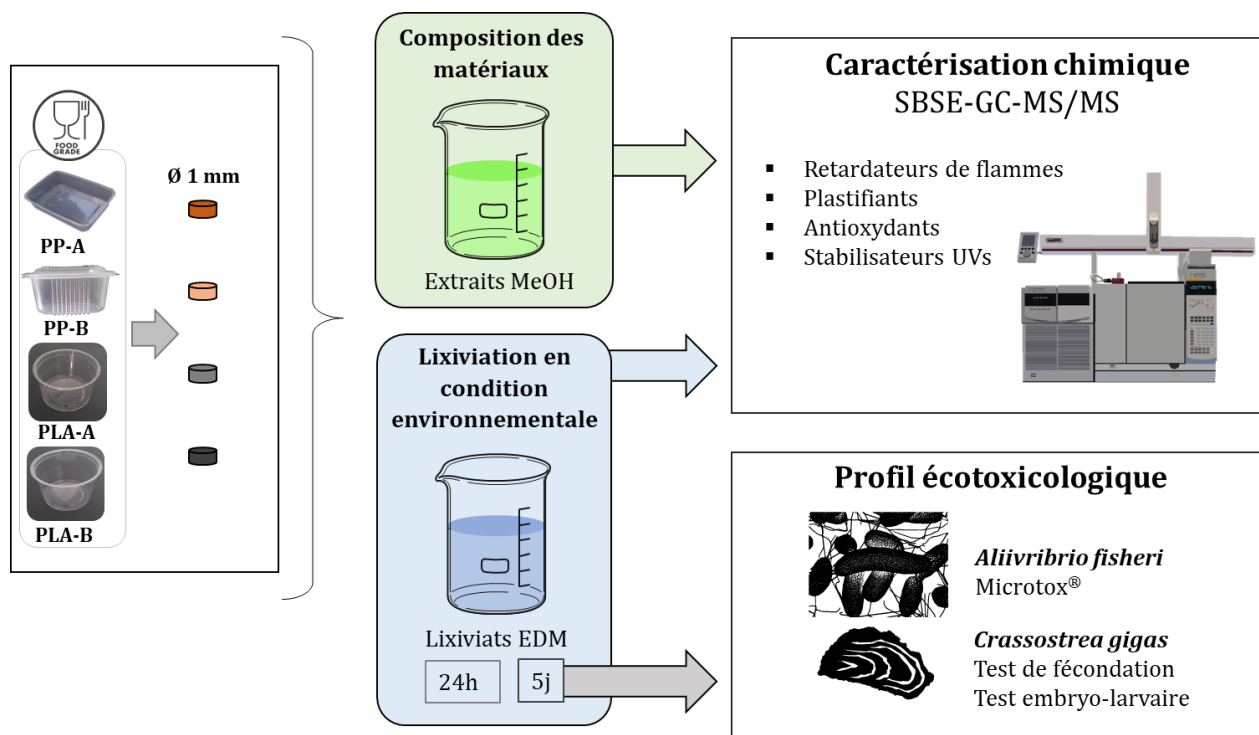


Figure 10 : Schéma de synthèse de la démarche expérimentale de l'étude présentée dans l'article 4 relative à l'étude des profils chimiques et écotoxicologiques des matériaux et lixiviats d'échantillons de barquettes alimentaires en polypropylène (PP) et acide polylactique (PLA). MeOH= méthanol; EDM= eau de mer.

<sup>10</sup> La larve D de l'huître est appelée ainsi car elle a une forme caractéristique de lettre « D ». Cette forme correspond au stade de développement de l'huître 24 h post fécondation, au moment où la minéralisation de la coquille embryonnaire débute et donne alors une forme de « D » à la coquille (Annexe 3).



2.1.1. Article 4

## **Additives in polypropylene and polylactic acid food packaging: chemical analysis and bioassays provide complementary tools for risk assessment**

**Fleurine Akoueson<sup>1,2</sup>, Ika Paul-Pont<sup>3</sup>, Kévin Tallec<sup>3,4</sup>, Arnaud Huvet<sup>3</sup>, Périne Doyen<sup>2</sup>, Alexandre Dehaut<sup>1</sup>, Guillaume Duflos<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> ANSES – LSAL, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

<sup>2</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, EA 7394, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Uni. Liège, F-62200, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup> Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280 Plouzané, France.

<sup>4</sup> Cedre, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France.

Corresponding author: [guillaume.duflos@anses.fr](mailto:guillaume.duflos@anses.fr)

### **Abstract**

Plastic food packaging represents 40% of the plastic production worldwide and belongs to the 10 most commonly found items in aquatic environments. They are characterized by high additives contents with more than 4000 formulations available on the market. Thus, they can release their constitutive chemicals (*i.e.* additives) into the surrounding environment, contributing to chemical pollution in aquatic systems and to contamination of marine organism up to the point of questioning the health of the consumer. In this context, the chemical and toxicological profiles of two types of polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA) food packaging were investigated, using *in vitro* bioassays and target gas chromatography mass spectrometry analyses. Plastic additives quantification was performed both on the raw materials and on the material leachates after 5 days of lixiviation in filtered natural seawater. The results showed that all samples (raw materials and leachates) contained additive compounds (*e.g.* phthalates plasticizers, phosphorous flame-retardants, antioxidants and UV-stabilizers). Differences in the number and concentration of additives between polymers and suppliers were also pointed out, indicating that the chemical signature cannot be generalized to a polymer and is rather product dependent. Nevertheless, no significant toxic effects was observed upon exposure to the leachates in two short-term bioassays targeting baseline toxicity (Microtox® test) and Pacific oyster *Crassostrea gigas* fertilization success and embryo-larval development. Overall, this study demonstrates that both petrochemical and bio-based food containers contain harmful additives and that it is not possible to predict material toxicity solely based on chemical analysis. Additionally, it highlights the complexity to assess and comprehend the additive content of plastic packaging due to the variability of their composition, suggesting that more transparency in polymer formulations is required to properly address the risk associated with such materials during their use and end of life.

### **Keywords**

Food containers, plastic, additives, leachates, bioassays

### **Highlights**

- Petro- and bio- based plastics packaging contains organic plastic additives
- Leaching of organic plastic additives was observed with all the tested protocols
- Differences in chemical signature between polymers and suppliers were observed
- Leachates from PP and PLA food containers did not show any *in vitro* toxicity

## 1. Introduction

Plastic debris is the major fraction of solid waste pollution in the marine environment. It is estimated that 75% of all marine litter is plastic (Napper and Thompson, 2020). Among this plastic pollution, approximately 50% of the items are food packaging materials (de Kock et al., 2020; Gerigny et al., 2018; OSPAR et al., 2010), of which polypropylene (PP) is one of the most employed resin. Its production accounts for 80-90% of the global plastic demand (PlasticEurope, 2021; Zimmermann et al., 2019), along with expanded polystyrenes (EPS) and polyethylene terephthalate (PET) (Iñiguez et al., 2016; Peng Zhou et al., 2011). More than 4000 chemicals are known to be in the composition of plastic packaging (Groh et al., 2019), including additives which are intentionally used to improve the properties of the material. A few review papers have highlighted the most common groups of additives in plastics, such as plasticizers, flames retardants, antioxidants and stabilizers (Fred-Ahmadu et al., 2020; Hahladakis et al., 2018). Many of the additives (*e.g.* bisphenols, phthalates, nonylphenols) are known to be hazardous, even at low concentrations, posing a risk for marine organisms (Hahladakis et al., 2018; Oehlmann et al., 2009) as a main driver of plastic toxicity (Beiras et al., 2021). The majority of plastic additives are not chemically bound to the plastic polymers and have the potential to leach out from the plastic to the surrounding environment (Andrady, 2011; Koelmans et al., 2014), causing various types of damages to organisms (*e.g.*, embryo development, immobility, physical activity, mortality, endocrine disruption, gene mutation). The ecotoxicity of some plastic leachates has been characterized on diverse aquatic organisms such as copepods, barnacles, oysters, mussels, urchins, lugworms, fish and photosynthetic bacteria (Gardon et al., 2020; Hamlin et al., 2015; Huang et al., 2021; Oliviero et al., 2019; K. Tallec et al., 2022; Tetu et al., 2019), without, however, identifying the compound(s) responsible for the observed toxicity. Just one single study (Tian et al., 2021) managed this demonstrating the link between the high concentration of a rubber additive subproduct and acute toxicity events in coho salmon.

The use of petro-based food packaging being controversial, bio-based plastics are more and more promoted as an alternative to conventional plastics, with a production volume which is expected to increase in the future (European Bioplastics, 2021; Geueke et al., 2014). The polylactic acid (PLA) is nowadays the most produced bio-based plastic, especially for food container (FC) products (Ncube et al., 2020). Either way, whether the materials are derived from a natural or petrochemical resource, they are both produced to fulfill the same function and are therefore similarly formulated. There are now some studies that gave first indications of the toxicity

of bio-based and biodegradable products and that also demonstrated that bio-based materials are not necessarily safer than conventional plastics (Chagas et al., 2021a; Chagas et al., 2021b; de Oliveira et al., 2021; Klein et al., 2021; Lambert and Wagner, 2017; Malafaia et al., 2021; Zimmermann et al., 2020a).

Moreover, concerns have arisen concerning the safety of FCs (Groh and Muncke, 2017) especially in regards to the migration of a wide variety of chemicals for which there is a lack of hazard information (Muncke, 2011). Therefore, it is important to explore the threats of complex and diverse chemical mixtures emitted by plastic products. However, although non-target screening analyses have previously been applied on plastics leachates, most of the chemicals remained unidentified (Muncke, 2011; Zimmermann et al., 2021). As a result, a better and more specified understanding of the composition of plastics is required to relate their chemical content and their toxicity.

The migration of compounds that are allowed to be included in FCs are only tested in regards to food contact application. However, plastic FCs are widely found in the environment and are therefore present as microplastics (MPs). Hence, it's important to question the impacts of these particles once in the environment. Thus, this study aims to assess and compare the chemical additive contents and the ecotoxicity of the chemicals leaching from plastic marketed FCs made of PP and PLA. Target chemical analyses were carried out by a stir bar sorptive extraction (SBSE) followed by a thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry in tandem (TD-GC-MS/MS) to characterize chemicals present in the plastics and the ones released in sea water leachates. In addition, we also assessed the leachates ecotoxicity through sensitive short-term bioassays: (i) the base line toxicity with the Microtox<sup>®</sup> test on the bioluminescent *Aliivibrio fischeri* bacteria, chosen as a rapid assay which is reproducible, cost effective and more sensitive than other end points for nonspecific toxicity (Neale et al., 2012), and (ii), two bivalve sensitive endpoints (His et al., 1999), fertilization and embryo-larval developmental success of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. This specie was targeted as a key organism for coastal ecosystems and because of its ecological and economical roles (FAO, 2020b).

## 2. Material and method

### 2.1. Plastic sample selection and production

In this study, four samples of food packaging items, available on the French market, made of polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA) were used. Two items were selected per polymer resin, produced by two different suppliers, tagged A and B.

Small punches, *i.e.* cylinders with a diameter of 1 mm, were cut into the food packaging items using

biopsy punches from Farla-Medical (Antwerpen, Belgium). Homogeneity of punches was assessed by measuring the thickness and the volume of  $n=20$  punches per polymer type using an Olympus SZX16 stereomicroscope (France) equipped with a UC90 camera and treated using OLYMPYS CellSens Dimension 3.2 software. Data are presented as a mean value  $\pm$  standard deviation (s.d.).

## 2.2. Extraction of potential additives

To avoid sample contamination, all glassware was burnt for 6h at 500°C in a Nabertherm LT40/11/B410 muffle furnace (Lilienthal, Germany) prior to the experiments. Additionally, the preparation of the material's leachates was conducted under a laminar flow hood.

### 2.2.1. Extraction of additives from the punch surface (methanol extracts)

$200 \pm 0.51$  mg of plastic punches were weighed for each plastic ( $n=4$ ). 10 mL of methanol (MeOH) (Sigma-Aldrich Co., Saint-Quentin-Fallavier, France) were added to the punches in order to obtain a concentration of 20 mg.mL<sup>-1</sup>. The mixtures were placed on an orbital shaker at 100 rpm for 24h, in dark conditions at room temperature (20 °C). A control experiment, *i.e.* MeOH treatment without any punch was also carried out following the same conditions. At the end of the extractions, the plastics were removed from the MeOH and the extracts were transferred into clean glass bottles and immediately submitted to chemical analysis (part 2.3).

### 2.2.2. Preparation of leachates in seawater

Leachates were prepared adding 2g of FC punch samples into 1L of filtered natural seawater (FSW) for each product. The FSW used for the leachate preparation was collected in Hardelot (France) autoclaved and filtered on Whatman™ 0.22 µm Millipore filters (Maidstone, United Kingdom). Each leachate was placed on an orbital shaker at 100 rpm, allowing the plastic pieces to move freely in the water. Leaching was performed for 24h and 5 days in dark conditions at room temperature (20°C) in order to be in accordance with previous studies mentioning a fast release of organic plastic additives (OPAs) within the first 120h (Gardon et al., 2020; Jang et al., 2021; Paluselli et al., 2019). Nine leaching treatments were prepared: PLA-A ( $n=2$ ), PLA-B ( $n=2$ ), PP-A ( $n=2$ ) and PP-B ( $n=2$ ) samples at 24h and 5 days, and a control seawater treatment without plastic. At the end of the leaching period, leachates were filtered through Whatman™ 1.6 µm GF/A filters (to remove punches), transferred to clean bottles and used as a stock solution for preparation of the six leachates concentrations levels obtained by serial dilutions: 0.02, 0.2, 2, 20, 200 and 2000 mg.L<sup>-1</sup>. The middle range concentration 0,2 and 2 mg.L<sup>-1</sup> were chosen to be in

similar range as to MPs concentration found in the marine environment, respectively medium and worst case scenario (Paul-Pont et al., 2018). All the leachate solutions were conserved at -20 °C during one week prior to the chemical characterization and the toxicity assays. For each treatment, 100 mL of the initial leachate (2000 mg.L<sup>-1</sup>) were sampled for chemical analysis.

## 2.3. Target chemical analyses

The OPAs were quantified in the methanolic extracts (cf. 2.2.1) and in the FSW leachates (cf. 2.2.2) in duplicates by SBSE-TD-GC-MS/MS following the methodology described by Lacroix et al. (2014).

Regarding the MeOH extracts, 1mL of the samples solutions were transferred to a clean glass bottle and supplemented by 9 mL of MeOH and 100 mL of FSW. For the seawater leachates, an aliquot of 100 mL was transferred to a clean glass bottle and 10 mL of MeOH was added. For both MeOH extract and seawater leachate, the prepared samples were doped with 10 ng of each deuterated standards, *i.e.* deuterated phthalates, deuterated polybromodiphényléters (PBDEs), deuterated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and deuterated nonylphenol (NPd8).

Gerstel Twister, 20 mm x 0.5 mm polydimethylsiloxane stir bar, (Mülheim an der Ruhr, Germany) were then placed in each sample on a MIX15 magnetic stirrer (Munich, Germany) and stirred at 700 rpm for 16 h of extraction in the dark at room temperature (20 °C). At the end of the extraction time, stir-bars were removed from the solutions, rinsed with distilled water, dried over a blot paper, and directly analyzed by TD-GC-MS/MS.

OPAs were analyzed using an Agilent 7890A gas chromatography system coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Little Falls, USA). GC-MS/MS device was equipped with a Gerstel thermal desorption unit (TDU) and a MultiPurpose Sampler in order to automatically introduce stir bars into the system. Thermodesorption were carried out at 280 °C for 6 min and samples were then cryofocused at -10 °C via a Gerstel cooled injection system (CIS). Analytes were injected in splitless mode into an Agilent HP-5MS GC column (Agilent Technologies) (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) and the CIS was heated to 310 °C at 12 °C.s<sup>-1</sup>. The detailed analytical condition of the GC temperature program and the MS are presented in Table S1. A stir bar conditioning was performed on each bar prior to re-use in order to eliminate any compounds not completely desorbed.

In total, 57 OPA's, *i.e.* 18 plasticizers, 19 flames retardants, 5 antioxidants and 15 stabilizers, were targeted and quantified (Table S2) based on criteria of use, toxicity, concentration in plastics and feasibility of GC-MS analysis. The quantitative analysis of plastic

additives was performed by external calibration using a multiple reaction monitoring (MRM) method divided into 4 groups containing a maximum of 20 transitions (Table S3) with two transitions for each compound. Several levels of calibration (*i.e.* 0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ng.L<sup>-1</sup>), in duplicate, were prepared. Data analysis was performed using Mass Hunter software from Agilent (10.2.733.8). Analytes were quantified by calculating the target additive/deuterated analyte ratio, and corrected by subtracting the blank (*i.e.* MeOH or FSW control without FC materials).

#### 2.4. Toxicity assessment on a unicellular organism - Microtox® assay

The Microtox® assay is an acute test measuring the baseline toxicity of a substance based on the decrease or inhibition of the bioluminescence of the bacteria *Aliivibrio fischeri* (Wadhia and Thompson, 2007). Here, this acute test was performed on each FSW leachate at the highest concentration (*i.e.* 2000 mg.L<sup>-1</sup>) and a control treatment (FSW with no addition of plastic), if no effect was observed, the lowest concentrations were not tested.

The bioluminescence level was measured by Modern Water Ltd Microtox® FX Analyser (New Castle, DE, USA), following the B-Tox Test procedure of the manufacturer's manual. Briefly, the lyophilized *A. fischeri* were rehydrated with 300 µL of the reconstituted solution (RS), the bacteria and the RS were gently mixed with a micropipette and 100 µL were immediately transferred into a clean test glass vial. After 15 min of exposure, 900 µL of working solutions, *i.e.* either FSW control or leachates, were added into the test vials. Measurements of the luminescence were recorded prior and 15 min after sample addition. The bioluminescence results were automatically compared and corrected with the light output of the control sample, resulting in a relative luminescence inhibition (%). Each assay was performed in triplicate.

#### 2.5. Toxicity assessment on an eukaryote organism - Oysters

##### 2.5.1. Biological material (animal and gamete collection)

Mature Pacific oysters were produced as described in Petton et al. (2015) and held in the Ifremer nursery in Bouin (France). In January 2022, a stock of 120 oysters (36 month old, average weight: 47.6 ± 7.2 g) was transferred from the Ifremer nursery to the Ifremer experimental facilities in Argenton (France) at stage 0 (*i.e.* the undifferentiated stage) and conditioned for 6 weeks with suitable conditions for germ cell maturation. Briefly, oysters were placed in an experimental raceway, using a flow-

through system with 20 µm-filtered running seawater at 18 ± 1.0 °C and fed with a mixed diet of two microalgae at a daily ration equal to 8% dry mass algae/ dry mass oyster. At ripeness (stage 3), oysters were randomly sampled to perform gametes and embryo-larval assays. Oyster sex was determined under an EVOS™ XL Core Imaging System microscope (ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA), × 10–20 magnification, on a 50-µL subsample from the gonad of each individual. Gametes from 3 males and 3 females were collected by stripping the gonad as described by Steele and Mulcahy (1999). This step was repeated in four replicates, with a total of 12 males and 12 females per condition. Sperm and oocytes solutions were then sieved at 60 µm in order to eliminate debris. Spermatozoa and oocytes were diluted with respectively 100 mL and 1 L of FSW at 20 °C, and left for 1 h prior to use to ensure gamete quality, *i.e.* spermatozoon mobility and round shape of oocytes, which were checked by microscopy (Tallec et al., 2018).

##### 2.5.2. Fertilization success assay

After collecting the gametes, their concentrations were assessed by flow cytometry using a EasyCyte Plus cytometer from Guava Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA). Gametes were placed at the same time in glass vials with a spermatozoa-to-oocyte ratio of 100: 1 and a final concentration of 1,000 oocytes.mL<sup>-1</sup>. Vials were filled with the different solutions of leachate to a final volume of 5 mL (4 leachates from FC, 6 concentrations: 0 (control FSW), 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg.L<sup>-1</sup>, and 4 replicates per condition, leading to 96 vials). After 1.5 h of exposition to FC leachates, samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to estimate the fertilization yield under a Zeiss Axio Observer Z1 microscope with ×10-40 magnification. Per vial, 100 oocytes were observed. An oocyte was considered fertilized when polar bodies or cell divisions were observable.

The fertilization yield (%) was estimated as: number of fertilized oocytes / total of oocytes × 100 (Martinez-Gomez et al., 2017).

##### 2.5.3. Embryo-larval assay

The standardized ISO 17244: 2015 assay (ISO, 2015) was used to determine the embryo-toxicity of FC leachates. Fertilization was carried out following the procedure described above, in 4 replicates, with gametes collected from 3 males and 3 females per replicates (total: 12 males and 12 females) in 2-L glass beakers filled with 1.5 L of FSW. Once fertilization was achieved with high fertilization yields (>90%) and embryos were at the 2-cell stage (verified using a Zeiss Axio Observer Z1; ×10-40 magnification), embryos were collected and placed in 25 mL of the different leachate treatments (control FSW, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 and 2000 mg.L<sup>-1</sup>) to achieve

60 embryos.mL<sup>-1</sup>. After 48h of exposure in dark conditions, all samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to estimate the normal D-larval yield. For each vial, 100 larvae were observed using a Zeiss Axiostar Observer Z1 microscope, with ×10-40 magnification. The normal D-larval yield (%) was defined as: number of normal D-larvae ÷ (number of normal + abnormal D-larvae) × 100. Abnormal D-larvae were identified based on morphological malformations (Mottier et al., 2013) such as shell, mantle or hinge malformations, developmental arrest during embryogenesis or evidence of larvae death, *e.g.* D-stage larvae with an empty shell.

## 2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R-Studio software (1.4.1106) (R Core Team). Concerning the bioassays, *i.e.* fertilization success, embryo-larval and Microtox® assay, all data expressed in percentages were normalized using  $\sin^{-1}(\sqrt{x})$  transformation. Normality and homoscedasticity were verified before carrying out two-way parametric ANOVA to test the differences in variables between factors, *i.e.* polymers and leachate concentration. When necessary a Tuckey's post hoc test was carried out using the *car* package (3.0-12) (Fox et al., 2022) was used to determine the significant differences between each group. Assuming that one of the hypotheses was not verified, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. Kruskal Wallis tests were followed by a Nemenyi's post hoc test using *agricolae* (1.3-5) (De Mendiburu, 2021) and *PMCMR* (4.4) (Pohlert, 2021) packages. Mean differences were considered as significant when  $p$ -value < 0.05. Data presented onto the figures are not square root transformed. Target chemical analyses were performed on leachates from all products, statistical significance of differences could not be carried out as only  $n = 2$  leachate solution were analyzed per item. Data were compared based on mix - max of these  $n = 2$  values.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of FC punch

The thickness ( $\mu\text{m}$ ) of each sample punches was measured, and the surface areas ( $\text{mm}^2$ ) and masses ( $\mu\text{g}$ ) were calculated (Table S4).

The thickness, surface area and mass for each resin sample were, respectively:  $277 \pm 10 \mu\text{m}$ ,  $2.44 \pm 0.01 \text{ mm}^2$  and  $272.00 \pm 0.01 \mu\text{g}$  for PLA-A,  $353 \pm 18 \mu\text{m}$ ,  $2.68 \pm 0.06 \text{ mm}^2$  and  $346.00 \pm 0.02 \mu\text{g}$  for PLA-B,  $451 \pm 13 \mu\text{m}$ ,  $2.99 \pm 0.04 \text{ mm}^2$  and  $340.00 \pm 0.01 \mu\text{g}$  for PP-A, and  $245 \pm 15 \mu\text{m}$ ,  $2.34 \pm 0.05 \text{ mm}^2$  and  $185.00 \pm 0.01 \mu\text{g}$  for PP-B.

Significant differences in mass were observed between all samples varying from 25 to 46%, except between PLA-B and PP-A (ANOVA followed by Tuckey post Hoc test,  $p$ -value < 0.05). Similarly, significant differences were observed in surface area between all samples (ANOVA followed by Tuckey post Hoc test,  $p$ -value < 0.05). However, within a polymer the punches metrics were homogeneous (Table S4 and Fig. S1).

### 3.2. Target OPAs TD-GC-MS/MS analyses into plastic food packaging materials (MeOH extracts)

A total of 21 compounds: 8 plasticizers, 3 phosphorous flame retardants, 5 antioxidants and 5 UV-stabilizers were quantified in all MeOH extracts (Fig. 1D).

The bio-based PLA samples contained the highest number of chemicals: 17 additives were identified in both PLA samples and only 8 to 9 additives were identified in PP samples. PLA and PP samples both contained a majority of plasticizers (respectively 7 compounds out of 17, and 6 compounds out of 8 to 9) and 3 UV-stabilizers. 6 compounds were common to both PP and PLA samples, *i.e.* plasticizers: Bis-2-Ethylhexyl Adipate (DEHA), Diisooheptyl phthalate (DIHP), Tributyl Acetyl Citrate (ATBC) and Tri(2-ethylhexyl) phosphate (TEHPA), UV stabilizers: UV-328 and UV-327 (Fig. 1A). However PFRs and nonylphenol antioxidants were exclusively identified in PLA extracts and absent from PP extracts.

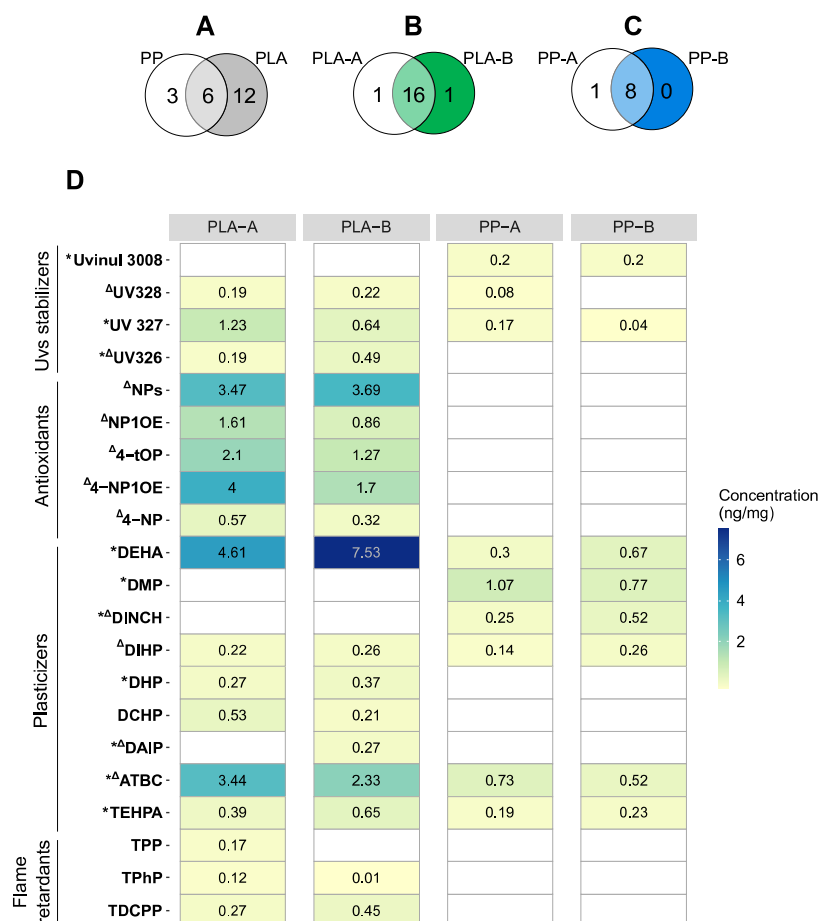
Overall, the number of OPAs within samples made of the same polymer, A and B, was equivalent: 17 OPAs were identified in both PLA-A and PLA-B, with 16 compounds in common plus one specific for each product (Fig. 1B). Concerning PP samples, 9 and 8 OPAs were detected in PP-A and PP-B respectively, with 8 compounds in common and one specific to PP-A (Fig. 1C).

The detected OPAs were quantified in the  $\text{ng.mg}^{-1}$  range (*i.e.* between 0.04 to  $7.5 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). For the 6 compounds common to both PP and PLA extracts, all the concentrations were higher in PLA extracts in comparison to PP samples (*e.g.* x5 for UV-328 and ATBC, x9 for UV-327, x2 for TEHPA and x12 for DEHA). The concentrations were considered higher when the factor was > x1.5.

Out of the 16 additives common to all PLA extracts, 7 compounds (Triphenyl Phosphate (TPhP), UV-327, Dicyclohexyl phthalate (DCHP), Nonylphenol Monoethoxylate (NP10E), 4-Tert-Octylphenol (4-t-OP), 4-Nonylphenol Monoethoxylate (4-NP10E) and 4-nonylphenol (4-NP)) were measured in higher concentrations (x12 for TPhP and x2 for the other OPAs) in PLA-A extracts than in extracts from PLA-B, and 4 compounds (UV-326, TEHPA, Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate (TDCPP) and DEHA) were measured in higher concentrations (x3 for UV-326 and x2 for the other OPAs) in PLA-B extracts

compared to PLA-A (Fig. 1D). For OPAs that are common in PP extracts, one compound out of 8 (UV-327) was measured in higher concentrations (x5) in PP-A extracts than in PP-B, and 3 (DEHA, Diisononyl hexahydrophthalate (DINCH) and DIHP) were

measured in higher concentrations (all x2) in PP-B extracts compared to PP-A (Fig. 1D).



**Figure 1:** Distribution of the chemical compounds identified by SBSE-TD-GC/MS in MeOH extracts of (A) PLA (A and B), (B) PP (A and B), (C) comparison of PLA and PP samples. (D) Heat map of the chemical compounds quantified in MeOH extracts. (n=2). Values were adjusted according to the chemicals found in the control (MeOH). The white color indicate that the quantitative value of the detected compounds was above the quantitation limit (<LQ).

\*: additives included in the positive list of the European Commission regulation EU No 10/2011 and the Synoptic Document (European Commission, 2005)

Δ: additives included in the Emerging toxic chemical list of Oltmanns et al., 2020 and Under REACH regulation.

With 4-NP: 4-nonylphenol; 4-NP10E: 4-Nonylphenol Monoethoxylate; 4-tOP: 4-Tert-Octylphenol; ATBC: Tributyl Acetyl Citrate; DAIP: Di-allyl phthalate; DCHP: Dicyclohexyl phthalate; DEHA: Bis-2-Ethylhexyl Adipate; DHP: Di-n-hexyl phthalate; DIHP: Diisooheptyl phthalate; DINCH: Diisononyl hexahydrophthalate; DMP: Dimethyl phthalate; NPs: Nonylphenols isomer; NP10E: Nonylphenol Monoethoxylate; TDCPP: Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate; TEHPA: Tri(2-ethylhexyl) phosphate; TPhP: Triphenyl Phosphate and TPP: Tripropyl Phosphate.

### 3.3. Target OPAs analyses into plastic food packaging leachates

#### 3.3.1. Impacts of the lixiviation duration on OPAs release

OPAs have been detected in all the leachate samples. Overall, the number of additives identified is slightly higher in the 5 days (5d) leachates than in the 24h leachates. A leaching time of 5 days permitted to retrieve the Tricresyl phosphate (TCrP),

Nonylphenols (NPs), NP10E, 4-NP10E and UV-328. For PLA-A, 10 and 11 compounds were identified in the 24h and 5d leachates respectively, with 10 compounds in common and one specific to the 5d leachates (Fig. 2A and 3A). For PLA-B, 8 and 9 compounds were identified in the 24h and 5d leachates respectively, with 8 compounds in common and one specific to the 5d leachates (Fig. 2B and 3B). Concerning PP leachates, 9 and 12 compounds were identified in the 24h and 5d PP-A leachates

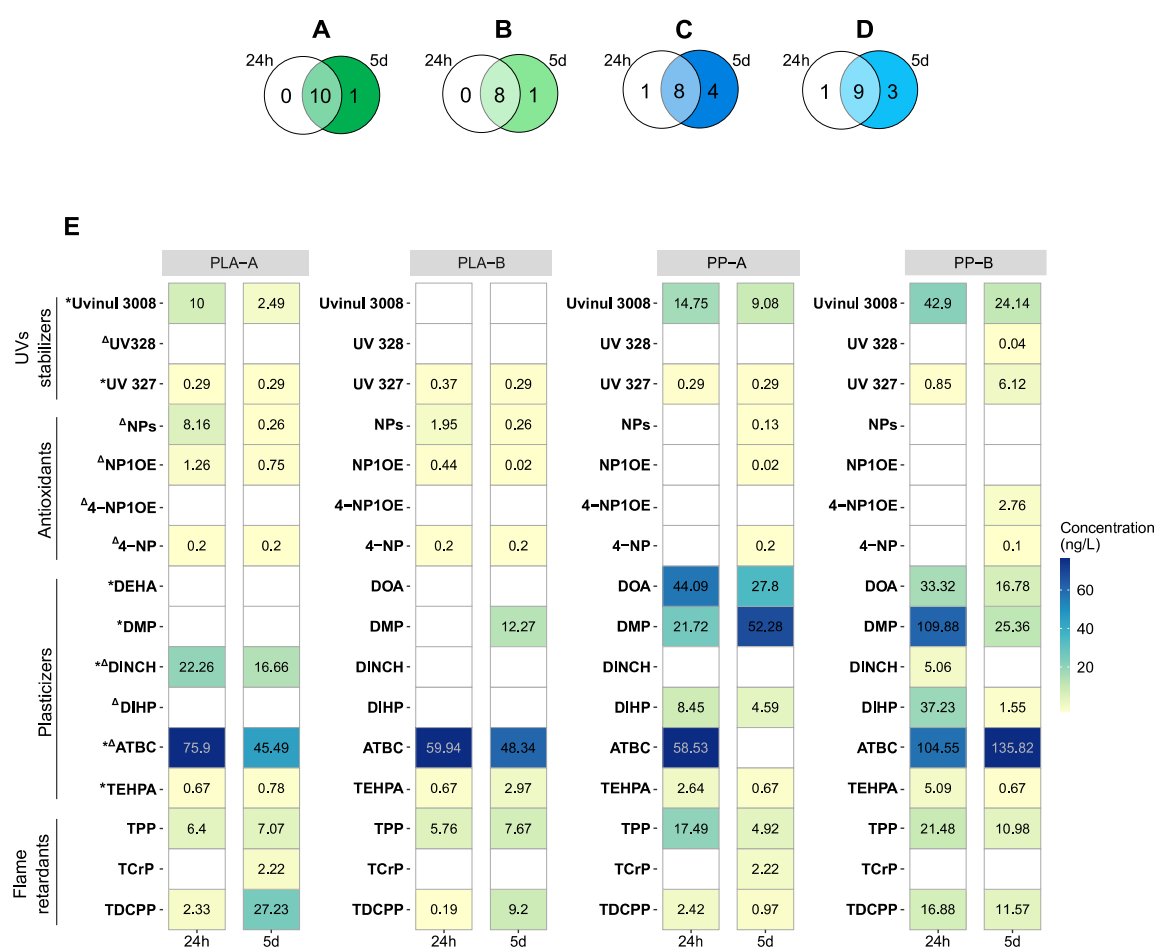
respectively, with 8 compounds in common, one in the 24h leachates only, and 4 specific to the 5d leachates (Fig. 2C and 3C). Finally, 10 and 12 compounds were identified in the 24h and 5d PP-B leachates respectively, with 9 compounds in common, one in the 24h leachates exclusively, and 3 specific to the 5d leachates (Fig. 2D and 3D).

The quantitative results do not show any clear pattern in 24h vs. 5d leachates. Concerning PLA-A leachates, 2 compounds (ATBC and NPs) were present in higher concentration in the 24h leachates, as well as two compounds (TDCPP and TCrP) that showed higher concentrations in the 5d leachates (Fig. 2E.1.). Similarly, the analysis of PLA-B leachates showed higher concentration for 3 compounds (ATBC, NPs and NP10E) in 24h leachates, as well as 3

compounds (Dimethyl phthalate (DMP), Tripropyl phosphate (TPP) and TDCPP) in 5d leachates (Fig. 2E.2.).

The PP-A 5d leachates presented higher concentrations for 5 compounds out of 13 (DMP, TCrP, NPs, 4-NP and NP10E), when the PP-A 24h leachate had higher concentrations for only 2 OPAs (ATBC and TPP) (Fig. 2E.3.). The PP-B leachate showed 4 compounds out of 13 with a higher concentration in the 24h leachates (DMP, DINCH, TPP and TDCPP). In contrast, the 5d leachate had higher concentrations for 3 compounds (ATBC, 4-NP10E and UV-327) (Fig. 2E.4.).

Considering the results presented above, the 5 days leaching time was chosen for the further chemical and ecotoxicological experiments.



**Figure 2:** Distribution of the chemical compounds identified by SBSE-TD-GC/MS in 24h and 5 days leachates of (A) PLA A, (B) PLA-B, (C) PP-A and (D) PP-B, at 2000 mg/L. (E) Heat map of the chemical compounds quantified in 24h and 5 days leachates of (E.1.) PLA A, (E.2.) PLA-B, (E.3.) PP-A and (E.4.) PP-B, at 2000 mg/L. (n=2). Values were adjusted according to the chemicals found in the control (seawater). The white color indicate that the quantitative value of the detected compounds was above the quantitation limit (<LQ).

\*: additives included in the positive list of the European Commission regulation EU No 10/2011 and the Synoptic Document (European Commission, 2005)

<sup>Δ</sup>: additives included in the Emerging toxic chemical list of Oltmanns et al, 2020 and Under REACH regulation.

With 4-NP: 4-nonylphenol; 4-NP10E: 4-Nonylphenol Monoethoxylate; ATBC: Tributyl Acetyl Citrate; DEHA: Bis-2-Ethylhexyl Adipate; DIHP: Diisoheptyl phthalate; DINCH: Diisononyl hexahydrophthalate; DMP: Dimethyl phthalate; NPs: Nonylphenols isomer; NP10E: Nonylphenol Monoethoxylate; TCrP: Tricresyl phosphate; TDCPP: Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate; TEHPA: Tri(2-ethylhexyl) phosphate and TPP: Tripropyl Phosphate.

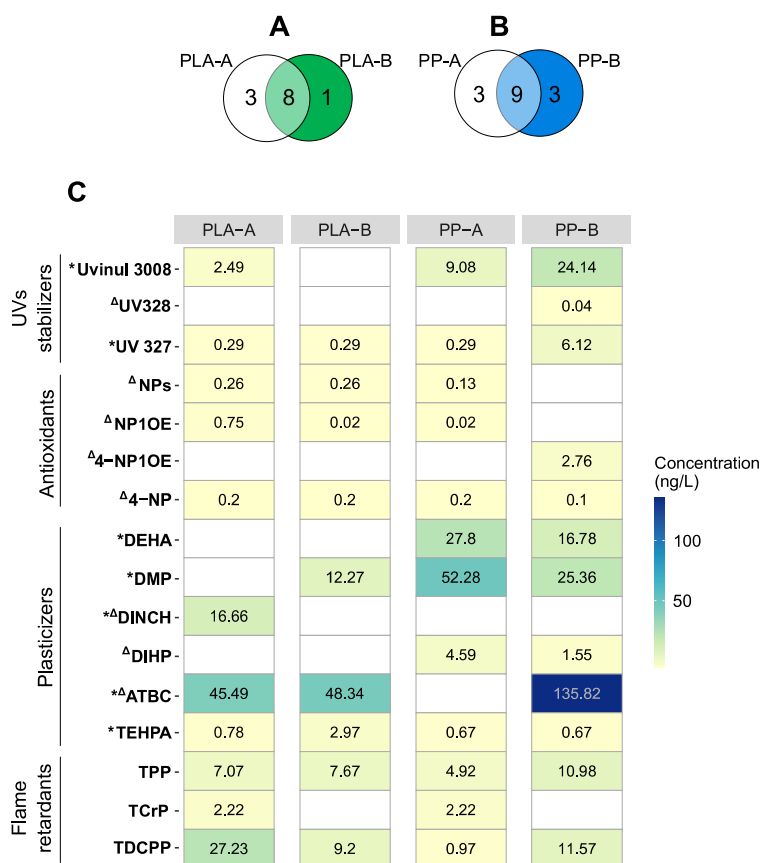
## 3.3.2. OPAs in food packaging's 5 days leachates

In 5d leachates from PP and PLA samples, a total 16 OPAs were detected. PLA leachate samples contained plasticizers (3 compounds out of 9 and 12 for A and B suppliers respectively), phosphorous flames retardants (3 and 2 compounds), antioxidants (3 compounds each) and UV-stabilizers (2 and 1 compounds). PP leachates samples contained a majority of plasticizers (4 and 5 compounds out of 12, for A and B suppliers respectively), followed by phosphorous flames retardants and antioxidants (3 and 2 compounds each), and UV-stabilizers (2 to 3 compounds). (Fig. 3C).

Beyond that, the number of OPAs between the PP and the PLA leachates was equivalent, with 11 and 9 OPAs identified in PLA-A and PLA-B respectively (8 common compounds, 3 compounds specific to the supplier A and one specific to the supplier B) (Fig. 3A), and 12 OPAs identified in both PP-A and PP-B

leachates (9 common OPAs and 3 specific to each suppliers) (Fig. 3B).

OPA concentrations in 5d FC leachates ranged between 0.02 and 135.82 ng.L<sup>-1</sup>. The quantitative results of OPAs do not show any clear patterns between the different leachate samples. Detailed results are presented in Figure 4C, and some tendencies, that illustrate differences between polymer leachates or suppliers, are given below: 2 plasticizers (DEHA and DIHP) were quantified exclusively in PP leachates (at concentrations ranging from 1.55 to 52.28 ng.L<sup>-1</sup>). DINCH was only found in PLA-A at a concentration of 16.66 ng.L<sup>-1</sup>. ATBC was quantified in PP leachates from the supplier B only (135.8 ng.L<sup>-1</sup>) at a concentration higher (x3) than in PLA-A and B leachates (46.9 ± 1.42). TCrP was only present in PP-A and PLA-A, both at a concentration of 2.22 ng.L<sup>-1</sup>. All the leachates contained UV-327 at similar concentrations (0.29 ng.L<sup>-1</sup>) except in PP-B where this additive was measured at higher (x21) concentration (6.12 ng.L<sup>-1</sup>) (Fig. 3C).



**Figure 3:** Distribution of the chemical compounds identified by SBSE-TD-GC/MS in 5 days leachates of (A) PLA (A and B), (B) PP (A and B), at 2000 mg/L. (C) Heat map of the chemical compounds quantified in leachates. (n=2). Values were adjusted according to the chemicals found in the control (seawater). The white color indicate that the quantitative value of the detected compounds was above the quantitation limit (<LQ).

\*: additives included in the positive list of the European Commission regulation EU No 10/2011 and the Synoptic Document (European Commission, 2005)

Δ: additives included in the Emerging toxic chemical list of Oltmanns et al., 2020 and Under REACH regulation.

With 4-NP: 4-nonylphenol; 4-NP1OE: 4-Nonylphenol Monoethoxylate; ATBC: Tributyl Acetyl Citrate; DEHA: Bis-2-Ethylhexyl Adipate; DIHP: Diisooheptyl phthalate; DINCH: Diisononyl hexahydrophthalate; DMP: Dimethyl phthalate; NPs: Nonylphenols isomer; NP1OE: Nonylphenol Monoethoxylate; TCrP: Tricresyl phosphate; TDCPP: Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate; TEHPA: Tri(2-ethylhexyl) phosphate and TPP: Tripropyl Phosphate.



3.3.3. Comparison of the additive contents between raw materials and seawater leachates

Some additives were only detected in PLA and PP MeOH extracts (Fig. 1D) but not in their respective leachates (Fig. 3C) (i.e. UV-328, UV-326, TPhP and DEHA for PLA and DINCH and ATBC for PP-A only; Fig S2). Conversely, some additives detected in leachates were absent from MeOH extract (i.e. TDCPP and 4-NP in PP samples, TPP in PP samples and PLA-B, DMP in PLA-B, NPs and NP10E in PP-A sample) (Fig. S2).

3.4. Evaluation of the ecotoxicity of plastic food packaging leachates

3.4.1. Baseline toxicity using Microtox® assay

No significant effect of leachate exposure was observed on the bioluminescence of the bacteria *Aliivibrio fischeri* (Fig. S3). The results showed less than 10% of bioluminescence inhibition regardless of the material and concentration used.

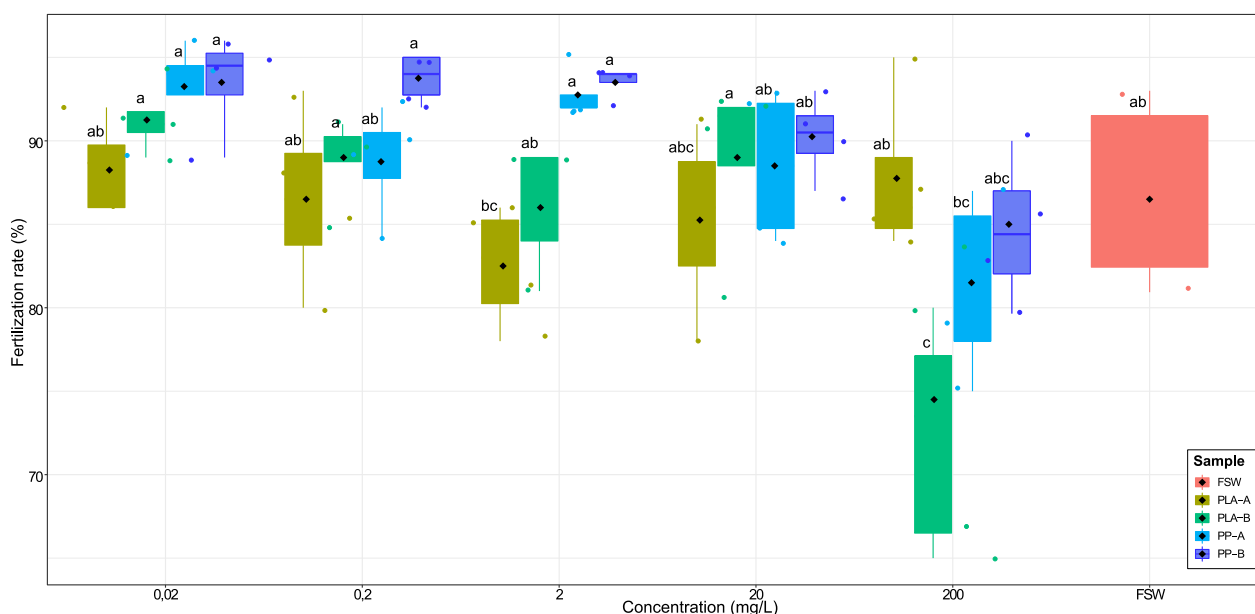
3.4.2. Early life stages of Pacific oyster

3.4.2.1. Effects of FC leachates on fertilization

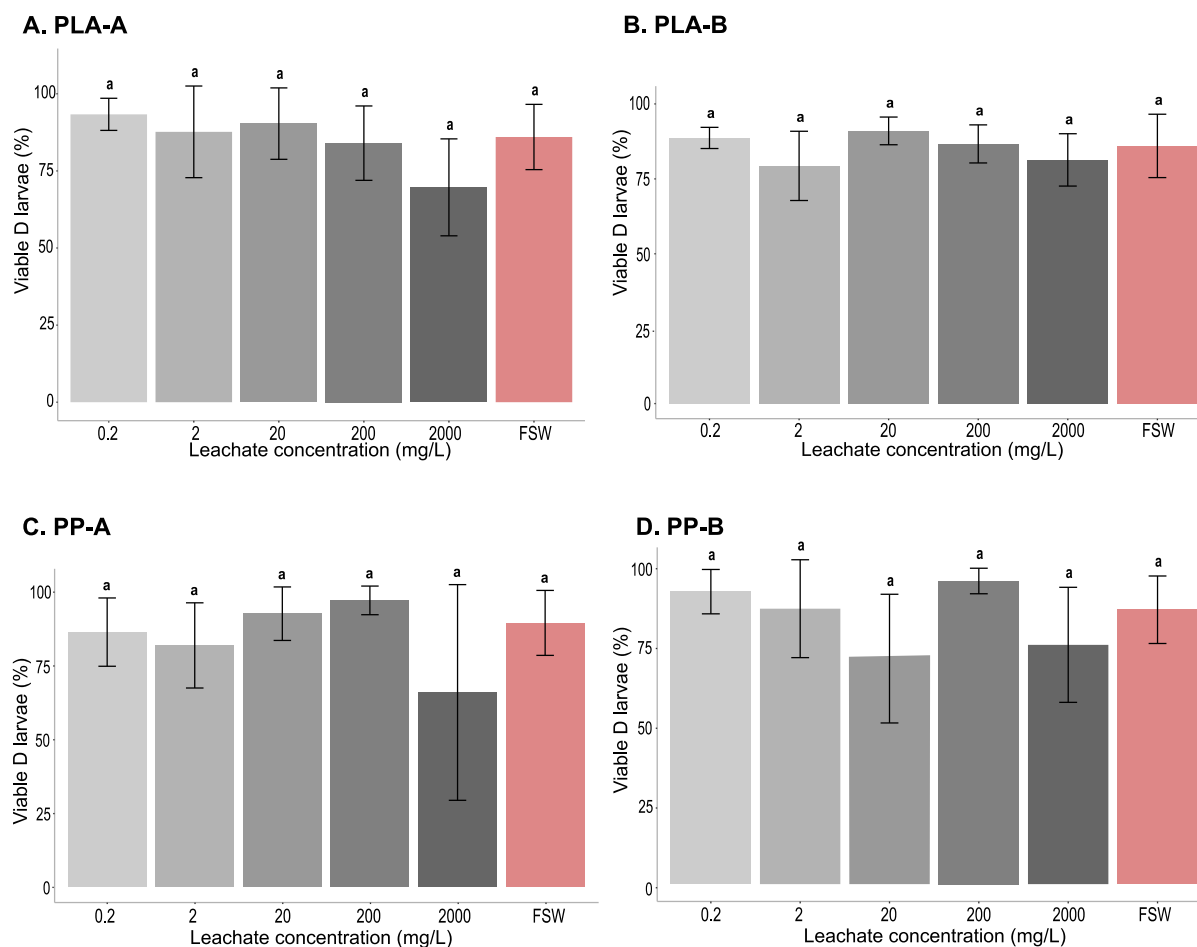
No significant differences (ANOVA, p-values > 0.05) were observed on the fertilization yield following the exposure of the oyster gametes to the different concentrations of plastic packaging leachates compared to the control treatment (i.e. FSW) (86.5 ± 6.5%). Only the highest concentration (i.e. 200 mg.L<sup>-1</sup>) of PLA-B significantly reduced the fertilization yield in comparison to the FSW control treatment (-12%; ANOVA followed by Tuckey post Hoc test, p-value < 0.05) (Fig. 4). Overall, the fecundation rate remained high (>70%) regardless of the treatment (except for PLA-B at 200mg.L<sup>-1</sup>).

3.4.2.2. Effects of FC leachates on oyster embryo-larval development

The percentage of normal D shaped larvae in controls was >80% (Fig. 5). None of the leachate concentrations induced embryo-toxicity (ANOVA or Kruskal-Wallis, p-values > 0.05) compared to the control treatment (mean D-larvae yield = 86 ± 9.2%) (Fig. 5).



**Figure 4:** Fertilization yield (%) after exposure (1.5h) of oyster gametes (oocytes + spermatozoa) to leachates of several food containers: PLA-A (yellow), PLA-B (green), PP-A (light blue) and PP-B (blue), at five concentrations: 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg/L, compared to the FSW control (Red). Homogeneous groups are indicated by the same letter. (n=4)



**Figure 5:** Normal D-larval yield (%) after exposure (46h) of fertilized oyster oocytes to leachates issued from (A) PLA-A, (B) PLA-B, (C) PP-A and (D) PP-B, food plastic packaging at five concentrations: 0.2, 2, 20, 200 and 2000 mg/L, compared to the FSW control. Homogeneous groups are indicated by the same letter. (n=3)

## 4. Discussion

### 4.1. Characterization of OPAs and their release from FCs

Material MeOH extracts and leachate analyses provided information on the chemicals associated with plastic packaging and those able to desorb into seawater. Despite some additives that were identified below the detection limit, 21 additives (*i.e.* phthalates, PFRs, antioxidants and UV-stabilizers) were successfully identified and quantified among the selected compounds. Only 10 of the identified chemicals are included in the positive list of Food Contact Substances for plastics of EU regulation No 10/2011 (European Commission, 2011a) (*e.g.* Uvinul 3008, UV 327, UV 326, DEHA, DMP, DINCH, DHP, Di-allyl phthalate (DAIP), ATBC and TEHPA), and 12 are included in the list established by Oltmanns et al. (2020) compiling 2336 potential emerging toxic chemicals used in FCs, based on a previous EFSA study

compiling substances registered under the REACH Regulation (*i.e.* UV 328, UV 326, DINCH, DIHP, DCHP, DAIP, ATBC and the NPs and their ethoxylated compounds). It means that for some of the additives not included in those regulatory lists, the sanitary risks remain unknown since no toxicological or migratory test has been performed.

It is noteworthy that in this study, the number of detected phthalates are underestimated since some phthalate compounds such as DEHP, DEP, DBP and DIDP could not be properly characterized because they were ubiquitous contaminants in the laboratory and instruments. Additionally, quantities of some additives, *e.g.* DMP and ATBC, recorded in the controls (MeOH and seawater without plastic) indicated presence of these compounds in the reagents employed in this experiment or contamination during sample preparation. Such results underline the difficulties and the challenge of studying additive composition of plastic in the laboratory (Zimmermann et al., 2019). Indeed, they are

omnipresent (*e.g.* found in indoor air, solvents, water, experimental apparatus, protection equipment, glassware) and may prevent their studies (Hermabessiere et al., 2020; Ye et al., 2013).

The higher additive occurrence and concentration (*e.g.* TDCPP in PLA-A, DMP in PP-A) observed in 5d leachates in comparison to 24h leachates was the basis for choosing a 5 days leaching time for further experiments. This was in agreement with other studies that used a leaching time of 5 days (CEN, 2002; Tetu et al., 2019), and studies that also demonstrated higher additive concentrations in 5d leachates than in 24h leachates (Gardon et al., 2020). It also permitted a great chemical desorption while avoiding the readsorption of the leached chemicals onto the surface of the plastic particle as noticed by Romera-Castillo et al. (2018). However, it is a complicated task to choose an appropriate leaching duration. Indeed, results published in the literature highlight the dependence of additives' desorption processes on many parameters including the polymer type and the additive. For instance, León et al. (2019) mentioned higher additive desorption rates for PP in comparison to PE. Additionally, the leaching dynamics differ according to the nature of additives. For example, the time needed to reach the desorption equilibrium concentration was estimated to be 3 days for BPA, while it was 80 days for phthalates compounds (Suhrhoff and Scholz-Böttcher, 2016).

Our results showed the presence of OPAs such as phosphorous flame retardants (PFRs), antioxidants and UV-stabilizers and with a dominance of plasticizer compounds (Fig. 1 and 3) both in MeOH extracts and leachates. Similar compounds have already been identified and quantified in diverse polymer FC items in the literature. For instance, ATBC and Uvinul 3008 (*i.e.* Octabenzene) were identified in PP samples (Lahimer et al., 2017; Zimmermann et al., 2019) and in plastic-based candy wrappers (Galmán Graíño et al., 2018). Several PAEs, ATBC and DINCH were detected in PVC FC (Carlos et al., 2018), and, Lahimer et al. (2017) identified UV 326 (*i.e.* Bumetrizole) in PLA samples.

Discrepancies in the chemical signature of MeOH extracts and leachates suggest that not all OPAs are leaching or that the concentration of the leachable additives was below the detection limit (Zimmermann et al., 2021). The presence of additives in leachates that were not detected in the MeOH extract (*e.g.* UV 326, TPhP, Di-n-hexyl phthalate (DHP), DCHP, DAIP and 4-OP) suggests a preferential migration or dissolution into water over methanol (Zimmermann et al., 2019; 2021).

On the one hand, differences in chemical composition and concentration of MeOH extracts between the two types of polymers selected were observed. A greater number of additives and higher concentrations were measured in bio-based PLA MeOH extracts in comparison to PP MeOH extracts,

which was also observed in the study of Zimmermann et al. (2019) study. Moreover, the presence of PFRs and nonylphenols antioxidants, exclusively identified in PLA extracts and absent from PP extracts, suggest that the bio-based PLA material contains more hazardous additives than the PP material. On the other hand, the number of additives between PLA and PP leachates was more or less equivalent and were only differentiated by the signatures and concentrations of additives which was not in accordance with other studies. For instance, using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to HR-MS, Klein et al. (2021) detected the highest number of chemicals and intensities in bio-based plastic leachates (PBAT + PLA) in comparison to other polymers including PP. The amount of additives in bio-based samples was even comparable to PVC, known to be a polymer containing larger amounts of plasticizers and stabilizers (Groh et al., 2019; Hahladakis et al., 2018). Gewert et al. (2018) also detected similarly low amounts of OPAs in PP using LC-HRMS, while Bradley et al. (2007) identified more chemicals but using a wide variety of analytical techniques. Additionally, Zimmermann et al. (2021) showed that products made of PLA leached relatively few products compared to PP. Evidentially, it is complex to draw conclusions about each type of plastic material, as their recipes and individual properties can be major factors in desorption.

Results also pointed out leaching differences between polymers. For instance, DEHA plasticizer, which is present in all the materials' MeOH extract samples (Fig 1D), leached in the SW only for PP samples. This may highlight a difference in leaching properties of additives between the two polymers used in this study, which could be explained by the nature of the polymer (Heng-Xiang Li et al., 2016) and notably their differences in physicochemical properties (*i.e.* surface and porosity) (Barrick et al., 2021).

The surface, known to significantly affect desorption (Bingbing Sun et al., 2021; Van de Ven, 1994), also differs between the sample resin and between the suppliers, but was considered homogeneous within each replicate of the same FC. However, despite the surfaces' disparities no relationship could be established with among leaching concentrations. As an example, the lower surface area of PP-B ( $2.34 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ ), compared to the other PP and PLA samples, is not related to lower quantities of additives.

#### 4.2. Complexity of plastic products' chemical composition

This study highlighted differences in the chemical composition and concentration between manufacturers. Diversity in chemical signatures and high variability of OPAs migration between polymers and suppliers have also been observed in a few studies (Hamlin et al., 2015; Zimmermann et al., 2019 and 2021) Zimmermann et al. (2019). Beyond differences in the formulation of each plastic product (Groh et al. 2019), highlighted by different chemical signatures in the MeOH extracts within a polymer type, the release of additives from plastic materials in leachates is also modulated by the permeability of the polymeric matrix, gaps between polymer molecules, physicochemical properties of the additives and properties of the surrounding medium (*e.g.* salinity, temperature, pH) and time (Kwan and Takada, 2016). It reinforces the challenge to assess the exhaustive chemical composition of plastic materials and leachates by current analytical methodologies (Bolgar et al., 2016; Jane Muncke et al., 2020).

Given the diversity of plastic associated chemicals (Groh et al., 2019) the target analysis based on 57 targeted additives (Table S1) is certainly not representative. Several studies have led a non-target screening of compounds in plastic food packaging, revealing more than 1000 chemical features in petro- and bio-based FC materials, including PP and PLA (Zimmermann et al., 2020a; Zimmermann et al., 2020b). Nonetheless, compounds identification with non-target screening approaches are approximate and care should be taken when interpreting the results. Zimmermann et al., (2020b; 2021) and von Eyken et al. (2020) demonstrates that most plastic chemicals remain unknown due to incorrect identification by databases. But this approach can however help to highlight patterns and emerging compounds. Additionally, targeting molecules of interest may help to show the presence of potentially toxic compounds, which will, in combination with ecotoxicological studies, be complementary to gain a global insight of the material risk.

Overall, this work provides information on the chemical composition of FC samples made out of PP and PLA, along with the identification of 21 additives in these materials and 16 that leached into SW, in particular phthalates, followed by flame retardants, antioxidants and UV stabilizers. Once released from the polymer matrix into the environment, those molecules can become available for organisms and could cause diverse effects such as endocrine disruption, reproductive, development, mutagenic or behavioral effects (Gunaalan et al., 2020; J. Muncke et al., 2020).

#### 4.3. Bioassays

The previous chemical analysis showed the leaching of some additive compounds known to be toxic to marine organisms (*e.g.* NPs and phthalates) (Hamlin et al., 2015; Hermabessiere et al., 2017; Schrank et al., 2019). However, no effects were observed in the study for any of the carried out bioassay, *i.e.* *Microtox*<sup>®</sup> base line toxicity test, fertilization and embryo-larval development of *C.gigas* for short leachate exposure times (a few minutes in *Microtox*<sup>®</sup> to 1.5 h for the oyster embryo-larval test).

Previous *in vitro* experiments conducted on plastic FC leachates (including PP and PLA) reported baseline toxicity migrating from the products (Szczepanska et al., 2018; Zimmermann et al. 2019; 2020b). Nonetheless, Zimmermann et al. (2020b) pointed out that toxicity was less prevalent in FCs than in plastic not intended to be in contact with food. Disparities of additive numbers and concentrations between manufacturers, as well as variation in base line toxicity depending on the products have also been reported (Klein et al., 2021; Zimmermann et al., 2019). However, the leached additives that were toxic *in vitro* remained mostly unidentified (Zimmermann et al., 2019).

Additionally, previous studies have demonstrated toxic impacts of various plastic leachates (not labelled FC) on fertilization or embryo development of diverse aquatic species such as oysters (Gardon et al., 2020; K. Tallec et al., 2022), mussels (Capolupo et al., 2020; Gandara et al., 2016) and urchins (Oliviero et al., 2019). However, it is important to highlight that most studies conducted their experiments with a worst-case scenario approach, *i.e.* with high concentrations of plastics (5 to 50 times higher than ours). In addition, some studies enhance migration with a polar solvent (dimethyl sulfoxide, dichloromethane, MeOH (Capolupo et al., 2020; Pannetier et al., 2019)), instead of testing migration using more realistic and softer solvents (*e.g.* seawater). Although the latter example aims to mimic the desorption of polar organic contaminants, it do not represent the conditions occurring in digestive guts of animals which are characterized by specific pH, digestive enzyme contents, and organic matter (Hermabessiere et al., 2020). Besides, in the case of FC studies, the leaching tests of additives are often performed according to the protocol set by the EU regulation for plastic FCs (*i.e.* during 10 days at 40 °C in the dark) (European Commission, 2011a; Zimmermann et al., 2021) which was not selected in this case as this work aimed at studying the impact of chemical release in the marine environment. Moreover, to the best of our knowledge, no study conducted analyses of plastic FC leachate in regards to their effects on fertilization and embryo toxicity. Thus, this present study could be a first

attempt to evaluate the effects of plastic FC leached chemicals on the gamete fertilization and embryonal development of an aquatic species.

As no toxic effects were observed, the estimation of the half maximal effective concentration (EC50) (*i.e.* indicating the concentration of a compound when 50% of its maximal effect is observed), that require a wider range of tested concentrations, was not possible, or, was higher than 2000 mg/L for all the polymer leachates and for all bioassays performed (*i.e.* embryo toxicity and Microtox®). Furthermore, the absence of toxicity can also be explained by an incomplete lixiviation of additives from the materials due to the low diffusivities of certain additives, like NPs, from certain rigid plastics (Berens, 1997; Koelmans et al., 2014), resulting in a low exposure of the test organisms to OPAs. In addition, in this study, leachates were produced in seawater in the dark. However, different environmental conditions such as water movement, salinity, UV irradiance, and environmental degradation processes, influence the leaching behavior of additives from plastic items. These environmental conditions can also facilitate the release of plastic chemicals and/or generate active compounds and, thus, can affect their toxicity to organisms (Huang et al., 2021; Klein et al., 2021). Likewise, in a human health sanitary safety approach, or in the case of OPAs release in the digestive tract after ingestion of micro particles, different and enhanced mechanisms of lixiviation may occur. For instance, NPs being lipophilic could be expected to more readily migrate into fatty foods over food with lower lipid content or seawater (Hamlin et al., 2015).

In any case, it should be kept in mind that “the absence of evidence is not evidence of absence” (Leslie and Depledge, 2020). Even if short-term acute bioassays are useful tools, they neither allow the observation of long term and transgenerational effects, nor the assessment of reproductive disruption effects, that are both widely suspected consequences of plastic additives.

## 5. Conclusions

The results demonstrate that all the tested products (PP and PLA polymers) contained and released OPAs into seawater under the tested conditions. The chemical content and the leachate composition differed from one polymer to another and, most importantly, variations were found among the same polymer type from one supplier to another. As a result, it was not possible to generalize and attribute a chemical pattern to a specific polymer type since variations were recorded at product level. Evidently, this part highlights the importance of the characterization of the “additivome”, *i.e.* the additive's content, of the microplastics used for toxicological tests.

Even if the results demonstrate that the tested petro- and biobased samples both leached additives compounds, none of the *in vitro* bioassay showed any acute toxicity of the leachates at relevant or high environmental concentrations, with the selected experimental conditions. However, although three different bioassays were tested, it is only possible to draw a conclusion for the perimeter of the conditions tested. As a result, beyond the standard tests applied for food contact packaging which imply that these materials do not transfer compounds to food, results showed that once in the environment the tested FC might not induce acute toxic effects. In future work, modifications of environmental parameters (*e.g.* temperature, microbial activity, UVs, weathering), organisms tested, and duration of exposure, may provide additional understanding of the toxicology associated with the leachates of these FCs.

## 6. Acknowledgements and fundings

Fleurine Akoueson is very grateful to the Hauts-de-France Regional Council and ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) for financially supporting her PhD scholarship. This work was also funded by the European Union (ERDF), the French government, the Hauts-de-France Regional Council and IFREMER, in the framework of the CPER MARCO. Fleurine Akoueson is grateful for the GDR Polymère et Océans 2050 from CNRS for their financial help. We are grateful to C. Lacroix, R. Jezequel and J.Receveur from the CEDRE (Brest, France) for their technical assistance. We would also like to thank the staff at the Argenton Ifremer station for providing mature experimental oysters. Finally, we would like to thank Nicolina Andersson for her careful English proofread of the manuscript.

## 7. Authors contribution

**F.Akoueson:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Validation, Visualization, Writing - original draft, review & editing. **K. Tallec:** Methodology, Writing - review & editing. **A. Huvet:** Methodology, Writing - review & editing. **I. Paul-Pont:** Methodology, Writing - review & editing. **P. Doyen:** Writing - review & editing. **A. Dehaut:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - review & editing. **G. Duflos:** Resources, Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

## 8. References

Les références sont listées page 184 du présent manuscrit.

## 9. Supplementary files

**Table S1: TD-GC-MS/MS analytical conditions**

Parameters	Settings
<b>GC</b>	
Injection port temperature	310 °C
Column temperature (°C)	70 °C (0.5 min) → 20 °C/min → 150 °C → 7 °C/min → 320 °C (5 min)
Injection mode	Split (split ratio 1: 5)
Carrier gas	Helium
Carrier Gas flow	1 mL.min <sup>-1</sup>
Transfer line temperature	300 °C
<b>MS</b>	
Ion source temperature	250 °C
Ionization method	Electron Ionization (EI), 70 eV.
Analytical mode	Single Ion Monitoring mode (SIM)
Scan time	50 – 80 ms
Acquisition frequency	2 cycles.s <sup>-1</sup>
Solvent Delay	3 min

Table S2: targeted organic plastic additives (OPAs)

N°	Additives	Abbreviation	CAS
<b>Plasticizers</b>			
1	Dimethyl phthalate	<b>DMP</b>	131-11-3
2	Diethyl phthalate	<b>DEP</b>	84-66-2
3	Di-allyl phthalate	<b>DAIP</b>	131-17-9
4	Diisobutyl phthalate	<b>DIBP</b>	84-69-5
5	Di-n-butyl phthalate	<b>DBP</b>	84-74-2
6	Tributyl Acetyl Citrate	<b>ATBC</b>	77-90-7
7	Di-n-hexyl phthalate	<b>DHP</b>	84-75-3
8	Benzyl butyl phthalate	<b>BBP</b>	85-68-7
9	Bis-2-Ethylhexyl Adipate	<b>DEHA</b>	103-23-1
10	Diisooheptyl phthalate	<b>DIHP</b>	71888-89-6
11	Tri(2-ethylhexyl) phosphate	<b>TEHPA</b>	78-42-2
12	Dicyclohexyl phthalate	<b>DCHP</b>	84-61-7
13	Bis(2-Ethylhexyl) phthalate	<b>DEHP</b>	117-81-7
14	Diisononyl hexahydrophthalate	<b>DINCH</b>	166412-78-8
15	Di-n-octyl phthalate	<b>DIOP</b>	117-84-0
16	Diisononyl phthalate	<b>DINP</b>	68515-48-0
17	Di-nonyl phthalate	<b>DNP</b>	84-76-4
18	Diisodecyl phthalate	<b>DIDP</b>	68515-49-1
<b>Flames retardants</b>			
19	Triethyl Phosphate	<b>TEP</b>	78-40-0
20	Tripropyl Phosphate	<b>TPP</b>	115-86-6
21	Tributyl Phosphate	<b>TBP</b>	126-73-8
22	2,4,6-Tribromophenol	<b>2,4,6,TBP</b>	118-79-6
23	Tris(2-Chloroethyl)Phosphate	<b>TCEP</b>	115-96-8
24	Tris(2-Chloroisopropyl)Phosphate	<b>TCPP</b>	13674-84-5
25	2,4,4'-Tribromodiphenyl ether	<b>BDE-28</b>	41318-75-6
26	Tris(1,3-Dichloro-2-Propyl)Phosphate	<b>TDCPP</b>	13674-87-8
27	Triphenyl Phosphate	<b>TPhP</b>	513-08-6
28	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether	<b>BDE-47</b>	5436-43-1
29	Tricresyl Phosphate	<b>TCP</b>	1330-78-5
30	Tricresyl Phosphate - isomer	<b>TCrP</b>	78-30-8
31	2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether	<b>BDE-100</b>	60348-60-9

N°	Additives	Abbreviation	CAS
<b>Flames retardants (continued)</b>			
32	Tri-o-tolyl phosphate	<b>TToP</b>	78-30-8
33	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether	<b>BDE-99</b>	189084-64-8
34	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether	<b>BDE-153</b>	68631-49-2
35	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether	<b>BDE-154</b>	207122-15-4
36	2,2',3,4,4',5,6'-Heptabromodiphenyl ether	<b>BDE-183</b>	207122-16-5
37	1,2-Bis (2,4,6 Tribromophenoxy) ethane	<b>BTBPE</b>	37853-59-1
<b>Antioxidants</b>			
38	6,6'-di-tert-butyl-2,2'-thiodi-p-cresol	<b>Irganox® 1081</b>	90-66-4
39	Butylated hydroxytoluene	<b>BHT</b>	128-37-0
40	pentaerythritol tetrakis (3-(3,5-di-t-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate	<b>Irganox® 1010</b>	6683-19-8
41	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamic acid, octadecyl ester	<b>Irganox® 1076</b>	2082-79-3
42	6,6'-ditert-butyl-4,4'-thiodin-m-cresol	<b>Lowinox® TBM-6</b>	96-69-5
<b>UV stabilizers</b>			
43	2,2-dihydroxy-4,4-dimethoxybenzophenone	<b>Uvinul® 3049</b>	131-54-4
44	2-t-Butyl-6(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol = bumetrizole	<b>UV-326</b>	3896-11-5-
45	2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-pentylphenol	<b>UV-328</b>	25973-55-1
46	2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	<b>UV-327</b>	3864-99-1
47	2-hydroxy-4-octyloxybenzophenone = octabenzone	<b>Uvinul 3008</b>	1843-05-6
<b>Antioxidants - plasticizers - stabilizers</b>			
48	4-Tert-Octylphenol	<b>4-t-OP</b>	140-66-9
49	Nonylphenol	<b>NPs</b>	84852-15-3
50	4-nonylphenol	<b>4-NP</b>	104-40-5
51	Nonylphenol Monoethoxylate	<b>NP1EO</b>	27986-36-3
52	Bisphenol F	<b>BPF</b>	620-92-8
53	4-Nonylphenol Monoethoxylate	<b>4-NP1EO</b>	104-35-8
54	Bisphenol A	<b>BPA</b>	80-05-7
55	Bisphenol B	<b>BPB</b>	77-40-7
56	Nonylphenol diethoxylate	<b>NP2EO</b>	NA
57	Bisphenol S	<b>BPS</b>	80-09-1



**Table S3: Method parameters for additives standards analytes.**

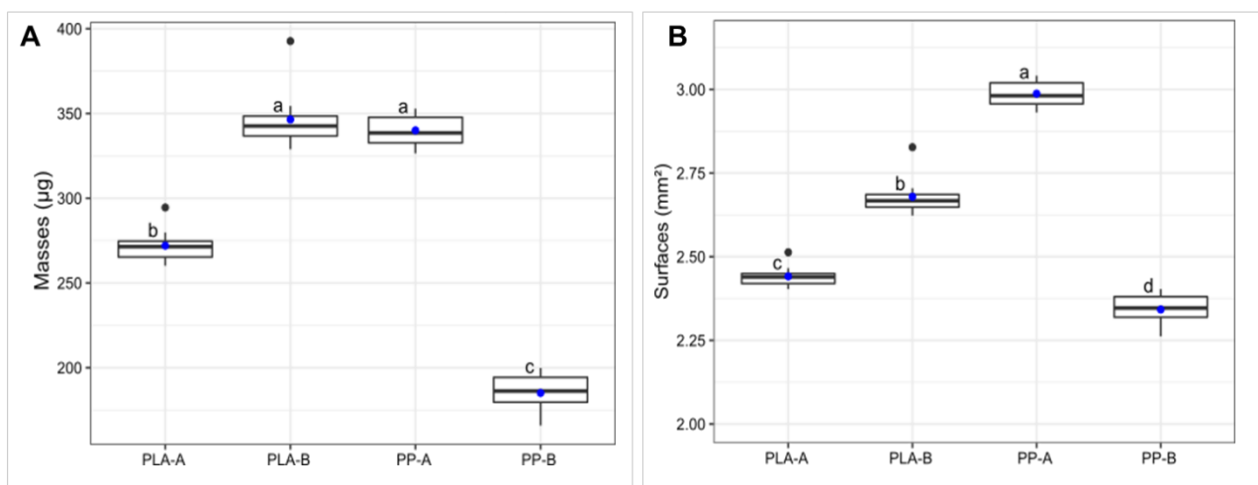
Compound	Transition : Precurseur -> product ion) (m/z)	Retention time (min)
TEP	155,3 -> 98,9	4,237
TPrP	183,4 -> 99,0	6,316
DMP	163,0 -> 77,0	7,128
BHT	220,0 -> 177,3	7,755
DEP	177,1 -> 149,0	8,668
4tOP	206,2 -> 135,1	8,816
TBP	155,3 -> 98,9	9,250
2.4.6-TBP	331,0 -> 331,0	9,434
NPs mix	135,0 -> 107,0	10,200
TCEP	249,0 -> 63,0	10,756
DAIP	149,0 -> 121,0	10,942
TCPP	277,0 -> 125,0	11,246
4-NP	107,0 -> 77,0	12,095
DIBP	149,0 -> 65,0	12,100
Irganox®1010	276,9 -> 147,1	13,066
DBP	149,0 -> 65,0	13,317
NP10E	179,0 -> 107,0	13,500
4-NP10E	107,0 -> 77,0	15,541
NP20E	223,0 -> 135,0	17,000
ATBC	259,3 -> 111,1	17,016
BDE 28	406,0 -> 246,0	17,090
TDCPP	211,0 -> 99,0	17,939
DHP	149,0 -> 65,0	17,997
BBP	238,1 -> 104,0	18,101
DEHA	129,0 -> 101,1	18,573
TPP	233,0 -> 233,0	19,100
TEHPA	211,4 -> 80,9	19,418

Compound	Transition : Precurseur -> product ion) (m/z)	Retention time (min)
DIHP	149,0 -> 149,0	19,500
Uvinul® 3049	257,0 -> 257,0	19,594
DCHP	149,0 -> 65,0	20,011
BDE 47	326,0 -> 326,0	20,074
DEHPd4	153,0 -> 97,0	20,237
DEHP	149,0 -> 121,0	20,258
UV 326	300,0 -> 300,0	20,370
BDE 77	486,0 -> 326,0	21,105
TCP	165,0 -> 165,0	21,426
UV-328	322,0 -> 322,0	21,491
DINCH	155,0 -> 155,0	21,500
UV-327	342,0 -> 342,0	21,588
TCrP	165,0 -> 165,0	21,731
TToP	165,0 -> 165,0	22,036
DIOP	149,0 -> 65,0	22,195
BDE 100	486,0 -> 326,0	22,236
DINP	149,0 -> 149,0	22,500
Uvinul® 3008	325,0 -> 325,0	22,589
BDE 99	404,0 -> 404,0	22,834
Lowinox® TBM-6	259,0 -> 259,0	23,588
DIDP	149,0 -> 149,0	24,000
DNP	149,0 -> 93,0	24,130
BDE 154	484,0 -> 484,0	24,542
BDE 153	484,0 -> 484,0	25,338
BDE 183	562,0 -> 562,0	27,747
BTBPE	356,0 -> 326,0	28,432
Irganox®1076	530,0 -> 515,0	30,043

**Table S4: Metrics (measured widths, calculated volumes, masses and surfaces) of all the PP and PLA punches analyzed (n=10). Cf. Fig. S1 for graph representations of masses and surfaces and their statistical analyses.**

Sample	Width ( $\mu\text{m}$ )	Volume ( $\text{mm}^3$ )	Mass ( $\mu\text{g}$ )	Surface ( $\text{mm}^2$ )
PP-A-1	435	0,34	328	2,94
PP-A-2	433	0,34	326	2,93
PP-A-3	468	0,37	353	3,04
PP-A-4	459	0,36	346	3,01
PP-A-5	439	0,34	331	2,95
PP-A-6	448	0,35	338	2,98
PP-A-7	468	0,37	353	3,04
PP-A-8	462	0,36	348	3,02
PP-A-9	450	0,35	339	2,98
PP-A-10	448	0,35	338	2,98
PP-B-1	259	0,20	195	2,38
PP-B-2	225	0,18	170	2,28
PP-B-3	257	0,20	194	2,38
PP-B-4	252	0,20	190	2,36
PP-B-5	258	0,20	195	2,38
PP-B-6	220	0,17	166	2,26
PP-B-7	265	0,21	200	2,40
PP-B-8	238	0,19	179	2,32
PP-B-9	242	0,19	182	2,33
PP-B-10	239	0,19	180	2,32
PLA-A-1	300	0,24	295	2,51
PLA-A-2	285	0,22	280	2,47
PLA-A-3	275	0,22	270	2,43
PLA-A-4	270	0,21	265	2,42
PLA-A-5	268	0,21	263	2,41
PLA-A-6	265	0,21	260	2,40
PLA-A-7	271	0,21	266	2,42
PLA-A-8	278	0,22	273	2,44
PLA-A-9	280	0,22	275	2,45
PLA-A-10	279	0,22	274	2,45
PLA-B-1	350	0,27	344	2,67
PLA-B-2	342	0,27	336	2,65
PLA-B-3	361	0,28	354	2,70
PLA-B-4	352	0,28	346	2,68
PLA-B-5	348	0,27	342	2,66
PLA-B-6	400	0,31	393	2,83
PLA-B-7	346	0,27	340	2,66
PLA-B-8	335	0,26	329	2,62
PLA-B-9	339	0,27	333	2,64
PLA-B-10	356	0,28	350	2,69

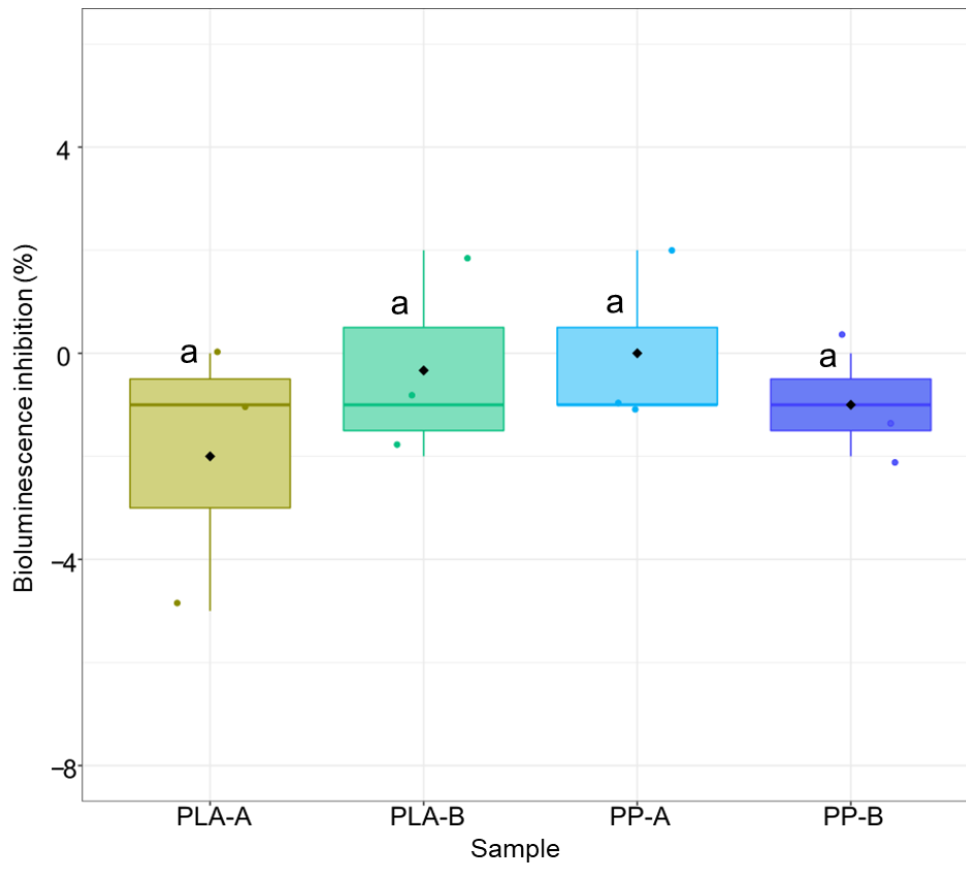
**Figure S1: (A) Calculated masses ( $\mu\text{g}$ ) and (B) calculated surfaces ( $\text{mm}^2$ ) of the analyzed PP and PLA punches. The blue dots represent the mean. The letters "a" to "d" correspond to the differences after statistical tests using ANOVA followed by Tuckey post Hoc test ( $p\text{-value} < 0.05$ ) ( $n=10$ ).**



**Figure S2: Presence/absence of the chemical compounds identified by SBSE-TD-GC/MS in Methanol extracts and seawater leachates (n=2). Green: presence of the compound; white: absence of the compound; "X": absence of the compound in MeOH extracts while identified in leachates (or vive-versa).**

Compounds	PLA-A		PLA-B		PP-A		PP-B	
	Extracts	Leachates	Extracts	Leachates	Extracts	Leachates	Extracts	Leachates
Uvinul 3008	X							
UV 328		X		X		X	X	
UV 327								
UV 326		X		X				
TPP			X		X		X	
TPhP		X		X				
TEHPA								
TDCPP					X		X	
TCrP	X				X			
NPs					X			
NP1OE					X			
DEHA		X		X				
DMP			X					
DINCH	X					X		X
DIHP		X		X				
DHP		X		X				
DCHP		X		X				
DAIP				X				
ATBC						X		
4-tOP		X		X				
4-NP1OE		X		X			X	
4-NP					X		X	

**Figure S3: Base line toxicity of plastic extracts in the Microtox assay. Data is presented as inhibition percentage (%) in comparison to the 0% inhibition of the filtered sea water (FSW) control. Homogeneous groups are indicated by the same letter. n=3.**



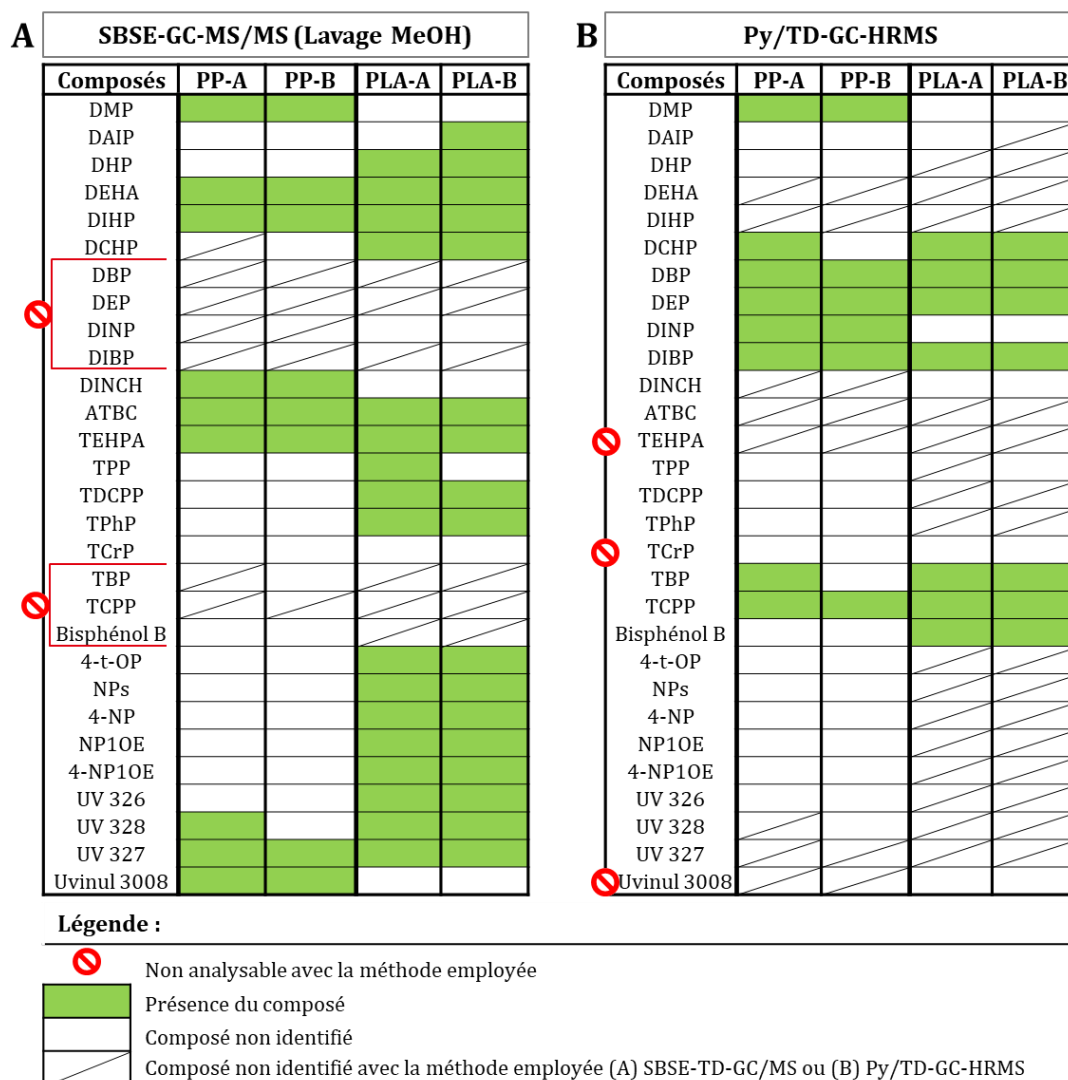
### 3. Résultats complémentaires

#### 3.1. Objectif de l'étude complémentaire

Cette partie concerne une analyse complémentaire relative à l'identification d'APOs dans les échantillons de barquettes alimentaires en PP et PLA. Les résultats d'identification des APOs via l'analyse par Py/TD-GC-HRMS (Chapitre 2) et par SBSE-GC-MS/MS (Chapitre 3) ont été comparés afin de discuter de la complémentarité de ces deux techniques.

#### 3.2. Résultats et discussion

Cette analyse complémentaire met en évidence une différence d'identification des additifs entre les deux analyses (**Figure 11**).



**Figure 11 : Présence/absence des additifs plastiques dans les barquettes alimentaires en PP et PLA, via (A) une analyse par SBSE-TD-GC/MS des extraits de méthanol et (B) une analyse par Py/TD-GC-HRMS des matériaux bruts.**

Sur un total de 28 additifs identifiés dans les barquettes alimentaires en PP et PLA, en prenant en compte les deux méthodes analytiques : seuls deux additifs (le DMP et le DCHP) ont été identifiés par les deux méthodes, 21 molécules l'ont été par SBSE-GC-MS/MS et 9 l'ont été par Py/TD-GC-HRMS. Par exemple, 4 plastifiants et 2 retardateurs de flamme phosphorés ont été identifiés uniquement par Py/TD-GC-HRMS, alors que 7 plastifiants, 3 retardateurs de flamme phosphorés, 5 alkylphénols antioxydants et 4 stabilisateurs UVs, ont été identifiés uniquement par SBSE-GC-MS/MS.

Ces résultats montrent une complémentarité de ces méthodes pour l'analyse d'APOs, pour des analytes difficilement ou non analysables selon les techniques employées.

Par exemple, la Py/TD-GC-HRMS a permis l'analyse de quatre molécules de phtalates (DBP, DEP, DINP et le DIBP) qui n'étaient pas analysables en SBSE-GC-MS/MS à cause de la présence de ces molécules dans tous les blancs d'analyses résultant en un signal de phtalates supérieur au signal dans les échantillons. Ceci peut être expliqué par une contamination potentielle des instruments et/ou du solvant utilisé pour l'extraction des composés, *i.e.* le méthanol. En effet, c'est un des biais majoritaires concernant l'analyse des additifs plastiques dû à l'omniprésence des plastiques dans notre environnement de travail. Hermabessiere et al. (2020) ont démontré cette complexité analytique en mettant en avant la présence d'un antioxydant, l'Irgafos® 168, dans tous les matériaux et réactifs utilisés lors des manipulations. L'ubiquité de cet additif et le niveau basal de contamination (*i.e.* supérieur aux concentrations ciblées dans l'étude), ont alors empêché la discrimination de l'additif réellement présent dans l'échantillon avec l'additif apporté par contamination extérieure. De par l'absence d'étapes de préparation de l'échantillon en amont de l'analyse, la pyrolyse est moins sujette à ces contaminations, et, dans le cas des analyses présentées précédemment, a pu permettre l'analyse de ces molécules de phtalates. Kim et al. (2016) ont aussi mentionné que l'extraction et l'analyse en Py-GC-MS multi-step permettait une meilleure identification des phtalates qu'une extraction au solvant suivi d'une analyse en GC-MS. En revanche, dans notre étude, l'analyse en SBSE-GC-MS/MS a permis l'identification d'un grand nombre d'additifs non détectés en Py/TD, dû à une limite de détection éventuellement trop basse par rapport aux quantités présentes dans les matériaux, ou bien du fait d'une extraction d'un plus grand nombre de composés par SBSE de par leur affinité avec le solvant utilisé (méthanol).

#### 4. Contribution de ces travaux

L'étude menée dans ce chapitre avait pour objectif premier d'étudier la lixiviation d'APOs de barquettes alimentaires dans différentes conditions : une condition utilisant du méthanol (représentant une condition de relargage stimulé d'additifs et utilisé en tant que proxy de la composition des matériaux), et une condition utilisant de l'eau de mer (se rapprochant des conditions environnementales).

En effet, même si les MCDA sont soumis à différentes normes concernant la migration des substances chimiques qui leur sont associées (European Commission, 2011a), ces normes concernent actuellement uniquement leur migration dans les denrées alimentaires. Au-delà de ce transfert, peu d'informations sont disponibles sur le transfert et la toxicité des MCDA en les considérant comme déchets une fois dans l'environnement.

Les expérimentations menées ont permis de mettre en évidence la lixiviation d'APOs (*i.e.* plastifiants, retardateurs de flamme, antioxydants et stabilisateurs UVs) à partir de barquettes alimentaires en PP et PLA dans de l'eau de mer.

Les résultats de l'analyse SBSE-GC-MS/MS des lixiviats EDM et d'extraits méthanolés ont montré une différence en nombre et en concentration d'additifs entre les polymères pétrosourcés et biosourcés (PP et PLA), ainsi qu'entre les fournisseurs pour un même polymère. Ceci suggère que la formulation chimique des plastiques est « item-dépendante ». Ceci rend particulièrement complexe l'évaluation du risque au regard de la diversité d'objets et débris plastiques affectant nos écosystèmes d'autant plus que certains additifs identifiés dans les échantillons en PLA ne sont pas autorisés par la réglementation.

Suite à l'exposition de divers organismes (*i.e.* *A. fisheri* et *C. gigas*) aux lixiviats de barquettes alimentaires, aucune toxicité significative n'a été observée pour les bioessais mis en place, suggérant une certaine innocuité des additifs désorbés en EDM et une absence d'effet cocktail dans les conditions expérimentales employées.

Finalement, l'analyse complémentaire concernant la comparaison de l'identification des APOs dans les matériaux de barquettes alimentaires par SBSE-GC-MS/MS et par Py/TD-GC-HRMS a permis de mettre en évidence la complémentarité de ces deux types d'analyses pour avoir une identification plus complète de la signature chimique des échantillons étudiés. Ceci souligne aussi la complexité, voire l'impossibilité, de mener une analyse d'identification exhaustive des additifs plastiques avec une seule méthode analytique.





# **CHAPITRE 4**

---

**Discussions et perspectives**

## **Chapitre 4 – Discussions et perspectives**

Les objectifs principaux des travaux menés dans cette thèse étaient d'apporter des informations sur la caractérisation chimique et les dangers des APOs pour les organismes marins et *in fine* pour les humains, en combinant deux approches complémentaires : la caractérisation chimique et l'évaluation écotoxicologique de matériaux plastiques. Afin de répondre à ces objectifs, ces travaux de recherche ont conduit à :

- Etablir un état des lieux des connaissances sur l'analyse des APOs, notamment en Py-GC-MS (**Chapitre 1 – Article 1**).
- La mise au point d'une méthode dite "globale" en Py/TD-GC-HRMS permettant à elle seule l'identification de 49 APOs, de différentes familles chimiques, avec la création et le partage d'une base de données spectrales obtenue en haute résolution (**Chapitre 2, Article 2**).
- L'identification de différents APOs dans des échantillons de nature polymérique différente (**Chapitre 2, Articles 2 et 3**).
- La mise en œuvre d'une expérimentation complémentaire de caractérisation chimique et écotoxicologique de matériaux et de leurs lixiviats dans de l'eau de mer *via* une analyse de la composition en additifs en SBSE-GC-MS/MS et la mise en place de bioessais sur *A. fisheri* (Test Microtox® B-Tox) et sur *C. gigas* (test de fécondation et de développement embryonnaire larvaire) (**Chapitre 3, Article 4**).

### **1. Analyse des additifs plastiques organiques**

#### **1.1. La méthode**

Les recherches scientifiques sur les additifs plastiques et sur les techniques analytiques permettant leur caractérisation, ont connu de nombreuses avancées. Malgré cet effort de recherche grandissant, beaucoup d'informations sont encore manquantes pour estimer, de façon fiable, les dangers d'une exposition à ces molécules pour les organismes marins et/ou les êtres humains.

Les principaux verrous et challenges de l'identification de ces molécules, comme expliqués dans le (Chapitre 1) sont notamment :

- La diversité et la complexité des formulations de plastiques
- L'émergence de molécules alternatives
- L'absence de communication des fabricants sur les molécules et les concentrations utilisées
- La complexité et les limites des techniques analytiques existantes

Pour cela, un premier travail a porté sur le développement et l'optimisation d'une méthode d'identification de divers APOs en Py/TD-GC-HRMS répondant à des critères de simplicité, rapidité, en limitant le nombre d'étapes de préparation des échantillons (Chapitre 2). Cette méthode, accompagnée de la base de données haute résolution créée, permettra de faciliter l'identification de ces APOs dans différents échantillons. A notre connaissance, cette méthode est la seule à proposer une application ciblée à une aussi grande diversité de composés.

Au regard de la méthode d'identification de 49 APOs développée dans cette thèse, plusieurs pistes de réflexions sont envisagées pour améliorer et étendre cette technique. Concernant la méthodologie, il est possible de proposer deux niveaux de réflexions sur des perspectives : (i) améliorer les limites de la méthode en proposant d'autres stratégies analytiques, et (ii) proposer une ouverture de la méthode développée sur de nouvelles applications.

### ***Amélioration des limites de la méthode***

La méthode développée n'est pas exhaustive puisque 7 additifs sur les 56 composés ciblés n'ont pas pu être détectés.

Une des solutions serait la dérivation de certaines molécules notamment pour les analytes dont l'analyse directe en GC-MS est compliquée voire impossible (*e.g.* température d'ébullition ou stabilité à la température inadaptée, sélectivité ou seuil de détection trop faibles). En effet, la dérivation permet de modifier la nature chimique du composé en produisant un dérivé plus volatile et/ou stable, et donc, d'augmenter la sensibilité de l'analyse (Sobeih et al., 2008). Différentes méthodes de dérivation existent mais la méthylation des analytes avec du TMAH (tétraméthylamonium hydroxyde) reste la réaction la plus souvent employée (Sobeih et al., 2008). Au cours de notre étude, le choix d'écarter cette procédure était volontaire dans une démarche de réduction et de simplification des étapes de préparation des échantillons. En effet, la méthode de dérivation est chronophage et, en plus d'être toxique et corrosif, l'ajout de TMAH peut apporter différentes complications : (i) dans le cadre d'une application sur des échantillons polymériques, le processus de dérivation est sensible à différents paramètres : matrices, additifs, agents dérivants, ainsi qu'à leurs interactions (Venema and Boom-Van Geest, 1995) et (ii) l'ajout d'impuretés qui peuvent empêcher ou compliquer la lecture des spectres et l'identification des additifs (Frederiksen et al., 2007; Venema and Boom-Van Geest, 1995). Ces limites exigeraient d'être très prudent sur l'interprétation des données après dérivation. Par ailleurs, ce choix de simplifier au maximum la méthode analytique a réduit la gamme d'additifs analysables. Toutefois, cette méthode a permis de caractériser les plus pertinents.

Afin d'obtenir une caractérisation chimique plus complète, une autre approche intéressante consisterait à combiner différentes méthodes d'extraction et d'analyses pour prendre en compte la diversité des polymères et des additifs et des spécificités des méthodes d'extraction et analytiques. Par exemple, la combinaison d'une technique d'extraction thermique et d'une extraction au solvant (ayant des affinités différentes et ciblant de ce fait différentes molécules) comme cela a été montré dans le Chapitre 3 (partie 3) lors de la comparaison des données obtenues en Py/TD-GC-HRMS et SBSE-GC-MS/MS a permis d'obtenir des résultats complémentaires. Il faudrait systématiser ce processus analytique pour faire face à la complexité de composition et de formulation des matériaux plastiques. En conséquences de cette nécessité de combiner plusieurs techniques afin d'avoir une analyse plus complète, et au vu des coûts élevés pour posséder plusieurs instrumentations, il serait intéressant d'augmenter les collaborations inter-laboratoires pour mettre en commun les expertises et les instruments analytiques de chacun.

### ***Perspectives d'applications***

Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant de compléter le développement méthodologique sur deux aspects :

- Le développement d'une méthode quantitative pour l'analyse d'APOs dans les matrices polymériques.

En pyrolyse, la quantification reste encore une grande limite pour l'analyse des additifs plastiques (Article 1). Pour l'instant, seules des méthodes semi-quantitatives ont pu être développées. Les méthodes quantitatives développées jusqu'à présent partagent le problème de proposer des limites de quantification trop élevées, empêchant alors le dosage d'APOs dans des échantillons de plastiques ou des échantillons environnementaux, pour lesquels les quantités en additifs sont souvent faibles (car à l'état de traces). De plus, de par les possibles interférences entre les additifs et les polymères (Bart, 2001), il faudra s'intéresser à la question des effets matrices dans la calibration en développant une méthode de quantification qui serait spécifique à chaque matrice polymérique à doser. Cela reste encore complexe notamment à cause de l'impossibilité ou la difficulté de se procurer des matériaux de références polymériques contenant des quantités connues et une diversité d'additifs.

Ce développement passerait donc inévitablement par la mise au point de matériaux de référence fabriqués à façon au laboratoire avec des quantités connues d'additifs inclus dans une matrice polymérique adaptée à l'échantillon ciblé. Les gammes de calibrations seraient ainsi établies en prenant en compte les potentielles interférences entre additifs et polymère. Ceci ne pourrait s'appliquer que sur un nombre limité de composés au vu de la difficulté à préparer des échantillons de référence.

- L'adaptation de la méthode développée pour son application sur des matrices biologiques.

De nombreuses études ont maintenant démontré la présence de MPs dans les produits de la mer. Et, au fil du travail présenté dans le Chapitre 1, il a été mis en évidence que ces MPs pouvaient participer à la contamination en additifs dans l'environnement et les organismes marins. Cependant, des informations sont manquantes sur le niveau de contamination en additifs plastiques des organismes marins, notamment ceux consommés par l'Homme. Certaines molécules utilisées en tant qu'additifs plastiques (*i.e.* alkylphénols, phtalates, PBDEs) ont déjà été détectées dans le corps humain (*i.e.* sang, urines, tissus graisseux, liquide amniotique, lait maternel, etc.) (Meeker et al., 2009). De ce fait, l'évaluation de la contamination des produits de la mer serait d'une grande utilité pour évaluer le rôle de la consommation de produits de la mer dans l'exposition de l'Homme à ces composés souvent toxiques.

Actuellement, aucune étude en pyrolyse n'a encore porté sur l'analyse d'additifs directement dans un tissu biologique. De ce fait, à plus long terme, il serait très intéressant de pouvoir appliquer notre méthode sur des matrices biologiques (*e.g.* organismes marins consommés par l'Homme) à dessein d'identifier, et à terme de quantifier, directement les APOs dans divers organismes marins, les produits issus de la pêche ou de l'aquaculture et plus largement les produits alimentaires.

### 1.2. Les applications

Un autre élément de discussion de la méthode développée en Py/TD-GC-HRMS peut être évoqué sur l'étude des échantillons de barquettes alimentaires en PP et PLA (Chapitre 2) et l'analyse SBSE-GC-MS/MS des extraits MeOH de ces mêmes matériaux (*i.e.* proxi du matériau brut) (Chapitre 3) qui ont permis de mettre en évidence la présence d'APOs dont certains ont des caractéristiques toxiques CMR ou de perturbateurs endocriniens (*e.g.* phtalates, bisphénols).

L'une des conclusions sur l'ensemble de nos résultats, concerne la diversité des signatures chimiques des matériaux plastiques. Si la diversité des additifs identifiés entre deux types de polymères (ici le PP et le PLA) n'est pas étonnante, elle l'est un peu plus concernant deux produits composés d'un même polymère et ayant la même utilité. Plusieurs études dans la littérature ont également souligné une différence de profil chimique pour un même polymère issu de différents fournisseurs (Zimmermann et al., 2019; Zimmermann et al., 2020a) signifiant qu'il est compliqué de conclure et généraliser le contenu en additifs d'un produit en se basant uniquement sur sa fonction et la nature de son polymère. Cette diversité et cette impossibilité de généraliser la caractérisation chimique des matériaux, sur la base de leurs usages et de leurs natures polymériques, complexifient grandement les analyses chimiques, les études d'impacts (éco)toxicologiques pour établir un lien entre les effets observés et la composition chimique des matériaux. Dans les années à venir, de grands changements vont toucher l'industrie des plastiques en terme de composition en additifs. Suite à la

réglementation votée en 2022 visant à supprimer les substances chimiques les plus dangereuses des produits plastiques de grande consommation d'ici à 2030 (European Commission, 2022), de nouvelles molécules de substitution vont alors voir le jour. Pour ne pas soulever les mêmes questionnements de toxicité, de complexité et d'hétérogénéité des formulations, il serait opportun de profiter de ces obligations réglementaires pour engager une réflexion, à l'échelle européenne voire internationale, sur l'harmonisation ou la limitation des formulations des produits plastiques par usage et par polymères. Récemment, en avril 2020, « Chemforward » (un groupement collaboratif de distributeurs, de grandes marques et d'ONG) et le groupe de travail « Sustainable Packaging Coalition » ont mis en œuvre un outil gratuit ([Plastic Additive Optimization Tool](http://www.chemforward.org) - [www.chemforward.org](http://www.chemforward.org)) pour identifier des additifs de substitution moins dangereux et ainsi aider les fabricants à (ré)orienter leur choix de conception pour le développement de plastiques à usage unique et d'autres matériaux recyclables plus sûrs.

Deuxièmement, concernant l'analyse des barquettes en Py/TD-GC-HRMS, les résultats ont mis en avant de fortes variabilités pour un même échantillon et un même additif malgré les précautions prises pour « standardiser » la prise d'essai (*i.e.* utilisation de punches à biopsie pour découper des cylindres de 1 mm de diamètre), ainsi que pour le traitement du signal (*i.e.* normalisation du signal obtenu avec la masse mesurée). En comparant les résultats avec les analyses menées sur des pellets commerciaux en PE et PP (Chapitre 2), peu de variabilité a été observée pour ces échantillons. Dans le premier des cas, la question d'une bonne homogénéité de la répartition des additifs au sein du matériau peut se poser. En effet, les additifs peuvent être distribués de manière hétérogène dans le polymère (Bart, 2006), ce qui expliquerait les variabilités observées. Cette observation peut éventuellement être expliquée par les processus de transformations (*e.g.* moulage, l'extrusion, l'injection ou encore le thermoformage (Agassant and Haudin, 2007)) qui auraient pu modifier la répartition des additifs au sein des barquettes. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une cartographie approfondie qui consisterait à prélever à différents emplacements du produit afin de mieux estimer et prendre en compte cette variabilité. Si l'hypothèse est confirmée, la préparation des échantillons aurait besoin d'optimisations supplémentaires et aussi d'être adaptée selon la nature des échantillons. Par exemple, broyer une certaine quantité d'échantillons de matériaux finis pourrait être une solution qui permettrait d'homogénéiser la prise d'essai, quand une simple découpe d'échantillon de granulés commerciaux serait suffisante.

Troisièmement, concernant le rendement d'extraction de la méthode en Py/TD-GC-HRMS, une analyse des échantillons après broyage permettrait également d'apporter des informations supplémentaires. En effet, l'efficacité d'extraction de la méthode développée a été estimée par un calcul de ratio d'aire des additifs en considérant que la totalité de l'additif a été extrait au bout de trois étapes d'extractions *i.e.* aucun signal de l'additif au bout de la 3<sup>ème</sup> étape de TD à 350 °C pour un même échantillon. Les particules broyées analysées, plus petites, offriraient une surface d'échange plus élevée et de ce fait un relargage d'additifs plus important. La comparaison des résultats de ces deux

techniques nous permettrait de confirmer ou infirmer que l'extraction sur les punchs se fait à cœur et pas uniquement en surface. Les résultats ont montré une efficacité d'extraction entre 80 et 98% dès la 1<sup>ère</sup> étape d'extraction, pour la majorité des composés. Aucune étude de la sorte n'a été effectuée auparavant pour nous permettre de comparer nos résultats d'extractions. Quelques études ont estimé un taux d'extraction de leur méthode en Py-GC-MS, pour une analyse de phtalates, entre 78 et 117%, mais ces méthodes sont quantitatives ou semi-quantitatives et ont pu utiliser des matériaux de références additivés pour effectuer ce calcul (Kim et al., 2016; La Nasa et al., 2021; Yanagisawa et al., 2019). Dans notre cas, idéalement, si la production de matériaux de référence avec des concentrations en additifs connus est possible, il sera nécessaire de réaliser ce calcul.

Finalement, la méthode d'analyse qualitative développée en Py/TD-GC-HRMS pourrait montrer son utilité en analyse de routine sur des matrices brutes de denrées alimentaires en identifiant les APOs qu'ils pourraient contenir et *in fine* transférer au consommateur. A plus long terme il est envisageable d'utiliser les propriétés de la HRMS Full Scan pour mener une analyse non ciblée rétrospective et identifier de potentiels contaminants émergents, incluant les NIAS ou des sous-produits de dégradation et transformation, sous réserve que la méthode développée permette leur extraction.

## **2. Lixiviation d'APOs de matériaux plastiques et évaluation de leur toxicité *in vitro***

L'analyse en SBSE-GC-MS/MS (**Chapitre 3**) des lixiviats en EDM des barquettes alimentaires en PP et PLA ont permis d'identifier différents additifs ayant la capacité d'être désorbés dans un environnement liquide naturel, et dont certains ont des caractéristiques toxiques (*e.g.* phtalates, bisphénols, retardateurs de flamme). Cette étude a permis de souligner différents aspects de la lixiviation discutés ci-dessous.

La lixiviation d'APOs toxiques à partir de MCDA, après une incubation des plastiques pendant 5 jours dans l'EDM, a été observée autant pour les matériaux pétrosourcés que biosourcés. Comme observé dans l'analyse des matériaux bruts (Article 2 et Article 3), une différence de signatures chimiques a aussi été observée entre les lixiviats issus d'un même polymère entre deux fournisseurs différents. Ceci souligne la complexité à conclure et généraliser sur le contenu en additifs et donc de déterminer la possible toxicité d'un produit en se basant uniquement sur sa fonction et la nature de son polymère.



L'identification d'APOs considérés comme toxiques dans les lixiviats et matériaux en PLA, en nombre et quantités équivalents voire supérieurs en comparaison au PP (Chapitre 3), rejoint les précédentes études qui ont aussi identifié un plus grand nombre d'analytes et une toxicité *in vitro* équivalente pour les matériaux en PLA (Anderson and Shenkar, 2021; Zimmermann et al., 2019; Zimmermann et al., 2020a). Ce phénomène n'est d'ailleurs pas limité au PLA mais a déjà été observé pour d'autres polymères biosourcés pour lesquels les lixiviats ont montré une toxicité supérieure ou équivalente aux matériaux pétrosourcés : le polyhydroxybutyrate (PHB), (S. Göttermann et al., 2015; Uribe-Echeverría and Beiras, 2022), ainsi que le polyhydroxyalkanoates (PHA), le bio-PE et le bio-PET (Zimmermann et al., 2020a). Ces observations mettent en avant le fait que, malgré leur mention « biosourcée », ces polymères ne sont pas gage d'absence d'additifs toxiques, ni de toxicité. Le développement de ces produits pose la question de leurs impacts négatifs sur l'environnement. Cependant des disparités sont aussi observées entre les études, et il est compliqué de conclure et généraliser sur la lixiviation et la toxicité des lixiviats de plastiques pétro- et biosourcés à cause des nombreuses différences méthodologiques entre les études et de l'hétérogénéité des produits entre polymères et fournisseurs. Afin d'étoffer notre compréhension sur les mécanismes de lixiviation, en prenant en compte ces différences entre les polymères et les produits, il faudrait multiplier les tests de lixiviation sur des matériaux diversifiés. Cela pourrait être effectué en se focalisant par exemple sur des matrices polymériques émergentes telles que les plastiques biosourcés, et permettrait d'identifier des formulations plus écoresponsables et plus sûres, dès la création des produits (l'approche « safe-by-design » (van de Poel and Robaey, 2017)) dans l'accompagnement de filières de la plasturgie. Aussi, dans le contexte actuel qui tend vers des matériaux 100% plastiques recyclés d'ici 2025 (Loi AGEC – (Journal officiel, 2020)), il serait intéressant de mener des études sur la composition en additifs de ces matériaux recyclés et de leur capacité de relargage.

Pour finir, la dernière partie de ces travaux était consacrée à l'étude de la toxicité des lixiviats des échantillons de barquettes en PP et PLA sur deux organismes marins *via* trois bio-essais sensibles, *i.e.* un test de toxicité aigüe sur *A. fisheri* (le test Microtox® B-Tox), et deux tests de toxicité sur la fécondation et le développement de l'huître creuse *C. gigas*. Malgré la mise en évidence de la migration d'additifs des matériaux vers l'EDM à laquelle les organismes ont été exposés, aucun des lixiviats n'a montré de toxicité. Ces résultats sont rassurants, premièrement au vu de l'utilisation en contact alimentaire de ces échantillons, qui, contrairement aux autres types de produits plastiques, sont soumis à une réglementation sur la migration des additifs plastiques (European Commission, 2011a). De plus, aucun effet toxique n'a été observé suite à des expositions aux concentrations testées supérieures à celles pouvant être retrouvées dans l'environnement. Cependant, comme mentionné dans les Chapitres 1 et 3, les conditions environnementales, *i.e.* plus complexes et incluant différents paramètres, ont une influence sur la dégradation des MPs et donc sur la lixiviation des additifs en

accélération ou freinant le relargage des composés (*i.e.* courant, expositions UVs, forte température, salinité, pression des profondeurs) (Luo et al., 2022) ainsi que sur leur biodisponibilité et toxicité pour les organismes marins (Di Natale et al., 2022). Pour compléter notre étude, il serait intéressant d'inclure plus de paramètres mimant les conditions réelles qui simuleraient par exemple une exposition aux UVs, ou des variations de températures.

Concernant les tests de toxicité, l'écotoxicité des lixiviats des matériaux sélectionnés n'a été évaluée que sur deux modèles biologiques marins. Cependant, comme l'ont énoncé différentes études, l'ingestion de MPs et donc d'APOs par l'Homme *via* l'alimentation est inévitable, *e.g.* consommation de produits de la pêche, de viandes, de sel, etc. (Catarino et al., 2018). De ce fait, il est donc nécessaire de déterminer les impacts potentiels que peut avoir cette ingestion sur la santé humaine. A la suite de ces travaux de thèse, il est prévu de mener une étude exploratoire de toxicité sur les lignées cellulaires intestinale humaine (Caco2). Ceci permettra d'obtenir des informations supplémentaires dans une démarche de sécurité sanitaire dans le cadre d'exposition de l'Homme à ces additifs *via* l'ingestion de produits contaminés. Pour ce faire, nous envisageons de cribler de nombreux effets toxiques, *via* un large spectre de marqueurs cellulaires, *e.g.* cytotoxicité, inflammations, potentiels œstrogéniques ou androgéniques. Différents protocoles de lixiviation avec des solutions de simulants seront mis en place afin de mimer une migration des additifs vers les denrées alimentaires hydrophiles ou hydrophobes (éthanol, huiles végétales). Ces expérimentations seront menées dans le cadre d'un projet, pour lequel j'ai contribué au dépôt, entre les équipes LSAI-UPCPPA de l'Anses de Boulogne-sur-Mer et l'Unité de toxicologie de l'Anses de Fougères. Par ailleurs, le devenir des MPs en terme de relargage d'additifs après ingestion par l'Homme est très peu documenté. A plus long terme, des études de lixiviation en conditions digestives (buccales, stomacales et intestinales) se rapprochant du modèle humain grâce à des digesteurs (M-Arcol) (Fournier et al., 2021) qui miment les principales conditions comme le pH et la composition du microbiote pourraient être réalisées pour étudier le devenir des APOs dans le cadre d'une ingestion de MPs. De même il faudrait aussi envisager de pouvoir mener des investigations avec des approches long terme, exposition chronique, pour une meilleure évaluation de la toxicité des matériaux et additifs plastiques à la fois chez l'Homme et dans l'environnement (concept « One Health »).

Au-delà des points évoqués précédemment, en lien direct avec nos travaux, il peut être intéressant de discuter d'éléments généraux sur des manques constatés dans les études de lixiviation sur les matériaux plastiques.

- La sous-représentation des études de lixiviation dans des conditions réalistes.

Dans la littérature, différents effets toxiques ont été observés après des expositions d'organismes marins à des lixiviats de plastiques (Barrick et al., 2021; Gunaalan et al., 2020; Huang et al., 2021). Cependant beaucoup d'entre elles ont utilisé des concentrations en plastique (ratio solide/liquide) très élevées (Tableau 5 – Chapitre 1), soit des conditions de lixiviation utilisant du MeOH (Capolupo et al., 2020; Pannetier et al., 2019; Zimmermann et al., 2020b) dans le but de se placer dans un « worst case scenario » ou d'intensifier le relargage d'additifs. Des approches complémentaires plus réalistes, comme discutées ci-dessus, sont importantes pour observer des potentiels effets toxiques.

- Un manque d'harmonisation et de réglementation des études de lixiviations

Le travail bibliographique effectué au cours de cette thèse a permis d'observer de grandes différences dans les conditions utilisées pour la préparation de lixiviats plastiques ; au niveau des ratios solide/liquide, du temps d'incubation, des températures et des vitesses d'agitations (Tableau 5 – Chapitre 1). De ce fait, il est très compliqué de comparer ces études notamment quand elles présentent des résultats divergents, ou quand il faut les relier à des effets (éco)toxicologiques.

De même, concernant les matériaux plastiques, les normes de migrations et de toxicité existent uniquement pour les matériaux plastiques en contact avec les aliments, l'eau de boisson et les cosmétiques (Chapitre 1). Aucune norme ou réglementation, ni même de spécification, n'existent dans le cadre de la présence d'une partie de ces matériaux plastiques dans l'environnement lors de leur fin de vie. Seules les normes de biodégradabilité sur l'innocuité des matériaux biodégradables sont à ce jour appliquées mais concernent uniquement les milieux receveurs théoriquement « prévus » pour leur élimination, *i.e.* composts industriels, municipaux ou domestiques. Cependant, comme nous l'avons discuté tout au long de cette thèse, la lixiviation d'additifs plastiques à partir de matériaux plastiques conventionnels, biosourcés et biodégradables, a bien lieu dans l'environnement et dans les organismes (après ingestions de MPs) et peut engendrer différents impacts toxiques, pouvant *in fine* potentiellement impacter l'Homme. La réglementation sur le relargage d'additifs devrait s'élargir à tous les types de plastiques relativement à leur potentielle fin de vie dans tous les compartiments de l'environnement.

- Un manque de corrélation entre caractérisation chimique des lixiviats et l'observation de leurs effets toxiques

Parmi les études d'exposition d'organismes à des lixiviats de plastiques, peu d'entre elles ont caractérisé conjointement la composition chimique des lixiviats, alors que l'évaluation des impacts d'un échantillon devrait toujours être consolidée par une estimation qualitative et/ou quantitative de leur contenu chimique (Bucci et al., 2020; Gardon et al., 2020; Rochman et al., 2019). Certaines des études qui ont mené une évaluation chimique des lixiviats par une approche non ciblée ont mentionné la présence de composés chimiques sans avoir pu déterminer leur identité en raison des difficultés du traitement des données. Les analyses non ciblées peuvent en effet apporter des informations précieuses concernant des matrices complexes et sont souvent complémentaires des approches ciblées. Cependant, elles souffrent souvent d'une impossibilité à identifier les composés. En effet, les informations contenues dans les sources et les bases de données accessibles sont souvent incomplètes ou insuffisamment détaillées (Bejgarn et al., 2015; Groh et al., 2019; Zimmermann et al., 2020a).

Pour les études ayant pu identifier certains additifs dans les lixiviats, la toxicité a tout de même été attribuée au lixiviat entier car il reste très compliqué de la relier à une ou plusieurs molécules spécifiques. Cela pour différentes raisons : (i) une identification chimique non exhaustive de par la grande diversité des additifs plastiques et autres substances associées aux plastiques, (ii) la possibilité d'un effet synergique de plusieurs molécules, *i.e.* effet cocktail, et (iii) le manque de données sur la toxicité de beaucoup d'additifs connus. Par exemple, dans nos études (Articles 2 et 3), plusieurs molécules identifiées dans les matériaux et lixiviats ne sont pas incluses dans les listes réglementaires des substances autorisées à être utilisées dans les MCDA (European Commission, 2011c), ni enregistrées dans REACH (Oltmanns et al., 2020). Aucun test (éco)toxicologique ou de migration n'a donc été effectué sur ces molécules. Leur risque sanitaire est donc inconnu. Selon Groh et al. (2019), la classification du danger est uniquement disponible pour moins d'un tiers des substances associées aux plastiques. Pour cette raison, malgré le fait que ce soit un travail « titanesque », il devient urgent d'évaluer la toxicité d'un plus grand nombre de composés pour lesquels aucune donnée de toxicité n'est disponible. En 2012, l'EFSA mentionnait qu'encore trop peu d'informations (identification, toxicité, exposition) étaient disponibles sur les additifs plastiques, ce qui rendait la caractérisation des risques compliquée. C'est toujours le cas dix ans plus tard avec la mise sur le marché de nouvelles molécules. Par ailleurs, en vue de la directive adoptée par l'UE en 2022 (European Commission, 2022), interdisant l'utilisation de plusieurs milliers de substances comprenant des APOs toxiques très largement utilisés tels que les phtalates, les retardateurs de flamme et les bisphénols, de nouvelles molécules alternatives vont probablement voir le jour. Par conséquent, le développement de méthodes analytiques robustes sera d'autant plus important en vue d'une identification complète de ces nouvelles substances, ce qui permettra d'étayer les avis

scientifiques des autorités comme l'EFSA, et d'étoffer les bases de données. En plus de ces efforts de recherche, une plus grande transparence des fabricants concernant la composition chimique exacte des produits commercialisés est nécessaire en prolongement des exigences de la loi AGECE. Actuellement, le manque d'accès aux registres complets des produits chimiques inclus dans les matériaux plastiques et la restriction des industriels, sur l'accès à ces informations, portent préjudice à l'évaluation convenable des risques que peuvent avoir ces matériaux et compliquent les démarches analytiques d'identification. Aussi, et pour terminer, il serait nécessaire de faciliter les échanges conjoints entre fabricants et chercheurs qui permettraient d'une part, de faire grandement avancer les recherches de caractérisations chimiques et toxicologiques, et, d'autre part, permettraient aussi du côté des fabricants, de développer, épaulés par des scientifiques, de nouvelles molécules moins controversées.

### 3. Conclusion

Actuellement, la pollution plastique et les risques liés aux additifs qui lui sont associés reçoivent de plus en plus d'attention. Les développements de méthodes analytiques et d'évaluations écotoxicologiques ont déjà permis aujourd'hui de poser des mises en garde sur certains additifs qui ont été ou sont sur la voie d'une réduction d'utilisation, d'une réévaluation ou d'une suppression. Cette attention sur le sujet doit permettre de maintenir les efforts de recherches pour mieux comprendre les risques liés à l'exposition des additifs plastiques *via* différentes voies d'expositions, comme la consommation de produits de la mer.

Les travaux menés durant cette thèse ont permis d'apporter des informations sur l'identification d'APOs répertoriés comme dangereux et sur leur lixiviation à partir de matériaux alimentaires pétrosourcés et biosourcés, et leur toxicité par différents bioessais. La conclusion de cette étude est double. D'une part, les matériaux biosourcés sont susceptibles de contenir un grand nombre d'additifs toxiques comme les matériaux pétrosourcés dont certains ne sont soumis à aucune réglementation pour leur utilisation dans les MCDA. D'autre part, les études écotoxicologiques effectuées (toxicité aiguë sur *A. fisheri* et effets sur le développement des jeunes stades de vie de *C. gigas*) se montrent rassurantes puisqu'aucun des bioessais n'a montré de toxicité des lixiviats sur les organismes testés dans les conditions expérimentales retenues.

De plus, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les défis auxquels la recherche sur les matériaux plastiques est confrontée et la complexité à appréhender la composition chimique, la toxicité et le(s) risque(s) que posent les MPs et leurs additifs au regard de l'exposition des organismes et de l'Homme. De plus, les grandes perspectives de ce travail pourraient aider à répondre aux interrogations de demain concernant la caractérisation chimique et écotoxicologique de nouveaux matériaux en cours de développement.

# RÉFÉRENCES

## Références

- Académie des sciences. Les plastiques dans l'environnement. 2021. [https://www.academie-sciences.fr/pdf/rapport/20210316\\_plastiques\\_environnement.pdf](https://www.academie-sciences.fr/pdf/rapport/20210316_plastiques_environnement.pdf)
- Adams WJ, Biddinger GR, Robillard KA, Gorsuch JW. A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 1995; 14: 1569-1574.
- ADEME, Camille Lagnet, Florian Monlau, Claire Jacquet, Audrey Lallement, Guillaume Cazaudehore, et al. REVUE DES NORMES SUR LA BIODEGRADABILITE DES PLASTIQUES - Synthèse. 2020. <https://librairie.ademe.fr/consommer-autrement/303-revue-des-normes-sur-la-biodegradabilite-des-plastiques.html>
- Agassant J-F, Haudin JM. Mise en forme des polymères. Dunod, 2007.
- Akhbarizadeh R, Moore F, Keshavarzi B. Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf: a threat to human health? *Food Additives & Contaminants: Part A* 2019; 36: 1696-1708.
- Akoueson F, Chbib C, Dehaut A, Duflos G. Organic Plastic Additives High-Resolution Mass Spectra. In: Zenodo, editor, 2022.
- Akoueson F, Chbib C, Monchy S, Paul-Pont I, Doyen P, Dehaut A, et al. Identification and quantification of plastic additives using pyrolysis-GC/MS: A review. *Sci Total Environ* 2021; 773: 145073.
- Al-Odaini NA, Shim WJ, Han GM, Jang M, Hong SH. Enrichment of hexabromocyclododecanes in coastal sediments near aquaculture areas and a wastewater treatment plant in a semi-enclosed bay in South Korea. *Science of the Total Environment* 2015; 505: 290-298.
- Al-Sid-Cheikh M, Rowland SJ, Stevenson K, Rouleau C, Henry TB, Thompson RC. Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 14480-14486.
- Alaee M, Arias P, Sjödin A, Bergman Å. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international* 2003; 29: 683-689.
- Alin J, Hakkarainen M. Microwave Heating Causes Rapid Degradation of Antioxidants in Polypropylene Packaging, Leading to Greatly Increased Specific Migration to Food Simulants As Shown by ESI-MS and GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59: 5418-5427.
- Altekruse S, Bishop R, Baldy L, Thompson S, Wilson S, Ray B, et al. *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiology & Infection* 2000; 124: 489-495.
- Amato-Lourenço LF, Carvalho-Oliveira R, Júnior GR, dos Santos Galvão L, Ando RA, Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 416: 126124.
- Anderson G, Shenkar N. Potential effects of biodegradable single-use items in the sea: Polylactic acid (PLA) and solitary ascidians. *Environmental Pollution* 2021; 268: 115364.
- Andrady AL. Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 2011; 62: 1596-605.
- Andrady AL. The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 119: 12-22.
- ANSES. Avis relatif à l'identification en tant que substance extrêmement préoccupante (SVHC1) du Bisphénol B pour son caractère de perturbateur endocrinien. 2021. <https://www.anses.fr/fr/system/files/REACH2019SA0221.pdf>
- Aquaref. Surveillance des alkylphénols et éthoxylats. Aquaref. 2018. [https://www.aquaref.fr/system/files/Surveillance\\_alkylphenols\\_ethoxylats\\_V200217\\_V2\\_2.pdf](https://www.aquaref.fr/system/files/Surveillance_alkylphenols_ethoxylats_V200217_V2_2.pdf)
- ASTM-7823:14. American society for testing material D7823:14, Standard Test Method for Determination of Low Level,Regulated Phthalates in Poly (Vinyl Chloride) Plastics by ThermalDesorption-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.

- Atugoda T, Vithanage M, Wijesekara H, Bolan N, Sarmah AK, Bank MS, et al. Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products: Implications for vector transport. *Environment International* 2021; 149: 106367.
- Au SY, Lee CM, Weinstein JE, van den Hurk P, Klaine SJ. Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: Identifying critical research needs. *Integr Environ Assess Manag* 2017; 13: 505-509.
- Avio CG, Gorbi S, Milan M, Benedetti M, Fattorini D, d'Errico G, et al. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution* 2015; 198: 211-222.
- Baechler BR, Granek EF, Hunter MV, Conn KE. Microplastic concentrations in two Oregon bivalve species: Spatial, temporal, and species variability. *Limnology and Oceanography Letters* 2019a; 5: 54-65.
- Baechler BR, Stienbarger CD, Horn DA, Joseph J, Taylor AR, Granek EF, et al. Microplastic occurrence and effects in commercially harvested North American finfish and shellfish: Current knowledge and future directions. *Limnology and Oceanography Letters* 2019b; 5: 113-136.
- Bakir A, O'Connor IA, Rowland SJ, Hendriks AJ, Thompson RC. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. *Environmental pollution* 2016; 219: 56-65.
- Bakir A, Rowland SJ, Thompson RC. Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2014; 140: 14-21.
- Balbi T, Franzellitti S, Fabbri R, Montagna M, Fabbri E, Canesi L. Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects on gene transcription. *Environmental Pollution* 2016; 218: 996-1004.
- Bandow N, Will V, Wachtendorf V, Simon F-G. Contaminant release from aged microplastic. *Environmental Chemistry* 2017; 14.
- Barboza LGA, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Guilhermino L. Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. *Journal of Hazardous Materials* 2020a; 393: 122419.
- Barboza LGA, Dick Vethaak A, Lavorante BRBO, Lundebye A-K, Guilhermino L. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin* 2018; 133: 336-348.
- Barboza LGA, Lopes C, Oliveira P, Bessa F, Otero V, Henriques B, et al. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment* 2020b; 717: 134625.
- Barnes DK. Invasions by marine life on plastic debris. *Nature* 2002; 416: 808-809.
- Barnes DK, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* 2009; 364: 1985-1998.
- Barrick A, Champeau O, Chatel A, Manier N, Northcott G, Tremblay LA. Plastic additives: challenges in ecotox hazard assessment. *PeerJ* 2021; 9: e11300.
- Bart J. *Plastics additives: advanced industrial analysis*: IOS Press, 2006.
- Bart JC. *Additives in polymers: industrial analysis and applications*: John Wiley & Sons, 2005.
- Bart JCJ. Polymer/additive analysis by flash pyrolysis techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2001; 58-59: 3-28.
- Basheer C, Lee HK, Tan KS. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar Pollut Bull* 2004; 48: 1161-7.
- Batel A, Linti F, Scherer M, Erdinger L, Braunbeck T. 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* 2016; 35: 1656-66.



- Becerra V, Odermatt J. Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS. *Analyst* 2012; 137: 2250-9.
- Behairy A, Abd El-Rahman GI, Aly SS, Fahmy EM, Abd-Elhakim YM. Di (2-ethylhexyl) adipate plasticizer triggers hepatic, brain, and cardiac injury in rats: Mitigating effect of Peganum harmala oil. *Ecotoxicology and environmental safety* 2021; 208: 111620.
- Beiras R, Tato T. Microplastics do not increase toxicity of a hydrophobic organic chemical to marine plankton. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 138: 58-62.
- Beiras R, Verdejo E, Campoy-Lopez P, Vidal-Linan L. Aquatic toxicity of chemically defined microplastics can be explained by functional additives. *J Hazard Mater* 2021; 406: 124338.
- Bejgarn S, MacLeod M, Bogdal C, Breitholtz M. Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere* 2015; 132: 114-119.
- Bellas J, Albertosa M, Vidal-Liñán L, Besada V, Franco MÁ, Fumega J, et al. Combined use of chemical, biochemical and physiological variables in mussels for the assessment of marine pollution along the N-NW Spanish coast. *Marine environmental research* 2014; 96: 105-117.
- Berens AR. Predicting the migration of endocrine disrupters from rigid plastics. *Polymer Engineering & Science* 1997; 37: 391-395.
- Berge A, Cladiere M, Gasperi J, Coursimault A, Tassin B, Moilleron R. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 8057-76.
- Besseling E, Foekema EM, van den Heuvel-Greve MJ, Koelmans AA. The effect of microplastic on the uptake of chemicals by the lugworm *Arenicola marina* (L.) under environmentally relevant exposure conditions. *Environmental science & technology* 2017; 51: 8795-8804.
- Bhat VS, Durham JL, Ball GL, English JC. Derivation of an Oral Reference Dose (RfD) for the Nonphthalate Alternative Plasticizer 1,2-Cyclohexane Dicarboxylic Acid, Di-Isononyl Ester (DINCH). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2014; 17: 63-94.
- Bhattacharya P, Lin S, Turner JP, Ke PC. Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010; 114: 16556-16561.
- Bîrcă A, Gherasim O, Grumezescu V, Grumezescu AM. Introduction in thermoplastic and thermosetting polymers. Elsevier, 2019, pp. 1-28.
- Blackledge JM. Chapter 12 - Image Restoration and Reconstruction. In: Blackledge JM, editor. Woodhead Publishing, 2005, pp. 404-438.
- Boberg J, Christiansen S, Axelstad M, Kledal TS, Vinggaard AM, Dalgaard M, et al. Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reproductive Toxicology* 2011; 31: 200-209.
- Boerger CM, Lattin GL, Moore SL, Moore CJ. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine pollution bulletin* 2010; 60: 2275-2278.
- Bolgar M, Hubball J, Groeger J, Meronek S. Handbook for the chemical analysis of plastic and polymer additives. Vol second edition Taylor & Francis Group, 2016.
- Boonnorat J, Kanyatrakul A, Prakhongsak A, Ketbubpha K, Phattarapattamawong S, Treesubuntorn C, et al. Biototoxicity of landfill leachate effluent treated by two-stage acclimatized sludge AS system and antioxidant enzyme activity in *Cyprinus carpio*. *Chemosphere* 2021; 263: 128332.
- Boyle D, Catarino AI, Clark NJ, Henry TB. Polyvinyl chloride (PVC) plastic fragments release Pb additives that are bioavailable in zebrafish. *Environmental Pollution* 2020; 263: 114422.
- Bozec A. Veuille sur les différents matériaux d'emballage. 2010.
- Bradley E, Coulier L, Castle L. An investigation into the reaction and breakdown products from starting substances used to produce food contact plastics. 2007.
- Braun T, Ehrlich L, Henrich W, Koeppel S, Lomako I, Schwabl P, et al. Detection of Microplastic in Human Placenta and Meconium in a Clinical Setting. *Pharmaceutics*. 13, 2021.

- Bridson JH, Gaugler EC, Smith DA, Northcott GL, Gaw S. Leaching and extraction of additives from plastic pollution to inform environmental risk: A multidisciplinary review of analytical approaches. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 414: 125571.
- Brillant MG, MacDonald BA. Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density. *J Exp Mar Biol Ecol* 2000; 253: 211-227.
- Brocca D, Arvin E, Mosbæk H. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. *Water Research* 2002; 36: 3675-3680.
- Brooke L, Thursby G. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington DC, USA: Report for the United States EPA, Office of Water, Office of Science and Technology 2005.
- Browne MA, Crump P, Niven SJ, Teuten E, Tonkin A, Galloway T, et al. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental science & technology* 2011; 45: 9175-9179.
- Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RC. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology* 2008; 42: 5026-5031.
- Browne MA, Niven SJ, Galloway TS, Rowland SJ, Thompson RC. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology* 2013; 23: 2388-2392.
- Browning S, Beymer-Farris B, Seay JR. Addressing the challenges associated with plastic waste disposal and management in developing countries. *Current Opinion in Chemical Engineering* 2021; 32: 100682.
- Brydson JA. *Plastics materials*: Elsevier, 1999.
- BSEF. Bromine Science Environmental Forum, Consulté le: 02/09/2022, <http://www.bsef.com>,
- Bucci K, Tulio M, Rochman C. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological Applications* 2020; 30: e02044.
- Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental health perspectives* 2008; 116: 39-44.
- Campanale C, Massarelli C, Savino I, Locaputo V, Uricchio VF. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17.
- Campbell SH, Williamson PR, Hall BD. Microplastics in the gastrointestinal tracts of fish and the water from an urban prairie creek. *FACETS* 2017; 2: 395-409.
- Cao X-L, Corriveau J. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* 2008; 56: 6378-6381.
- Capolupo M, Sørensen L, Jayasena KDR, Booth AM, Fabbri E. Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Research* 2020; 169: 115270.
- Carlos KS, de Jager LS, Begley TH. Investigation of the primary plasticisers present in polyvinyl chloride (PVC) products currently authorised as food contact materials. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2018; 35: 1214-1222.
- Carlton JT, Chapman JW, Geller JB, Miller JA, Carlton DA, McCuller MI, et al. Tsunami-driven rafting: Transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. *Science* 2017; 357: 1402-1406.
- Carr KE, Smyth SH, McCullough MT, Morris JF, Moyes SM. Morphological aspects of interactions between microparticles and mammalian cells: intestinal uptake and onward movement. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 2012; 46: 185-252.
- Carr SA, Liu J, Tesoro AG. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water research* 2016; 91: 174-182.
- Castello G, Moretti P, Vezzani S. Retention models for programmed gas chromatography. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1607-23.
- Catarino AI, Macchia V, Sanderson WG, Thompson RC, Henry TB. Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. *Environmental Pollution* 2018; 237: 675-684.

- CDC, Prevention CfDCA. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, 2005.
- CEN CEdN. Characterization of waste. Leaching. Compliance test for leaching of granular waste materials and sluges. Part 4: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 mm (without or with size reduction). CEN, 2002.
- Cesa FS, Turra A, Baruque-Ramos J. Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: a review from textile perspective with a focus on domestic washings. *Science of the total environment* 2017; 598: 1116-1129.
- Chae Y, Hong SH, An Y-J. Photosynthesis enhancement in four marine microalgal species exposed to expanded polystyrene leachate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2020; 189: 109936.
- Chagas TQ, Araújo APdC, Malafaia G. Biomicroplastics versus conventional microplastics: An insight on the toxicity of these polymers in dragonfly larvae. *Science of The Total Environment* 2021a; 761: 143231.
- Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, et al. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2021b; 277: 130279.
- Challinor JM. A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 1989; 16: 323-333.
- Challinor JM. Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2001; 61: 3-34.
- Chang M. Microplastics in facial exfoliating cleansers. Michelle chang microplastics in facial exfoliating cleansers. Spring 2013.
- Chang M. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. *Marine pollution bulletin* 2015; 101: 330-333.
- Chang X, Xue Y, Li J, Zou L, Tang M. Potential health impact of environmental micro-and nanoplastics pollution. *Journal of Applied Toxicology* 2020; 40: 4-15.
- Chattelier C, Lestremau F. Considérations sur certains aspects metrologiques liés à la mesure du 4-nonylphénol - Etat de l'art et perspectives - Rapport AQUAREF 2014. 2014. [https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/2014\\_109.pdf](https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/2014_109.pdf)
- Chemie Wirtschaftsförderungs - GmbH.CAMPUS® CWFG mbH, a material information system for the plastics industry, Consulté le: 01/08/2022, <https://www.campusplastics.com/campus/list,Frankfurt> am Main
- Chen C, Chen L, Yao Y, Artigas F, Huang Q, Zhang W. Organotin Release from Polyvinyl Chloride Microplastics and Concurrent Photodegradation in Water: Impacts from Salinity, Dissolved Organic Matter, and Light Exposure. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 10741-10752.
- Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng Y-L, Wu Y, et al. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology* 2016; 50: 5438-5453.
- Chen Q, Allgeier A, Yin D, Hollert H. Leaching of endocrine disrupting chemicals from marine microplastics and mesoplastics under common life stress conditions. *Environment International* 2019; 130: 104938.
- Cheng Z, Nie X-P, Wang H-S, Wong M-H. Risk assessments of human exposure to bioaccessible phthalate esters through market fish consumption. *Environment international* 2013; 57: 75-80.
- Chiellini F, Ferri M, Morelli A, Dipaola L, Latini G. Perspectives on alternatives to phthalate plasticized poly (vinyl chloride) in medical devices applications. *Progress in polymer science* 2013; 38: 1067-1088.
- Chokwe TB, Okonkwo JO, Nwamadi MS. Occurrence and distribution of tetrabromobisphenol A and its derivative in river sediments from Vaal River Catchment, South Africa. *Emerging Contaminants* 2017; 3: 121-126.
- Chua EM, Shimeta J, Nugegoda D, Morrison PD, Clarke BO. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. *Environmental science & technology* 2014; 48: 8127-8134.

- CITEO.Tri et recyclage des emballages en plastique : on fait le point !,Consulté le: 20/09/2022,<https://www.citeo.com/le-mag/infographie-tri-et-recyclage-des-emballages-en-plastique-fait-le-point>,
- Coffin S, Huang G-Y, Lee I, Schlenk D. Fish and Seabird Gut Conditions Enhance Desorption of Estrogenic Chemicals from Commonly-Ingested Plastic Items. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 4588-4599.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin* 2011; 62: 2588-2597.
- Convention de Stockholm.Guidance for the inventory of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) listed under the Stockholm Convention on POPs,Consulté le: 02/09/2022,<http://chm.pops.int/Implementation/NIPs/Guidance/GuidancefortheinventoryofPBDEs/tabid/3171/Default.aspx,Stockholm> Convention
- Convention de Stockholm.Guidance for the inventory, identification and substitution of Hexabromocyclododecane (HBCD),Consulté le: 02/09/2022,<http://chm.pops.int/Implementation/NationalImplementationPlans/GuidanceArchive/GuidanceforHBCD/tabid/5332/Default.aspx,Stockholm> Convention
- Covaci A, Gerecke AC, Law RJ, Voorspoels S, Kohler M, Heeb NV, et al. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: a review. *Environmental science & technology* 2006; 40: 3679-3688.
- Covaci A, Harrad S, Abdallah MA-E, Ali N, Law RJ, Herzke D, et al. Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment international* 2011; 37: 532-556.
- Covaci A, Voorspoels S, Abdallah MA-E, Geens T, Harrad S, Law RJ. Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 346-363.
- Cox KD, Covernton GA, Davies HL, Dower JF, Juanes F, Dudas SE. Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 7068-7074.
- Craver CD, Carraher Jr CE, McSweeney E. HISTORY OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY DIVISION OF POLYMERIC MATERIALS: SCIENCE AND ENGINEERING. *Applied Polymer Science: 21st Century* 2000: 3.
- Creceley RW, Day CE. Analytical methods for additives in plastics. Springer, 1998, pp. 26-31.
- Cuadros-Rodríguez L, Bagur-González MG, Sánchez-Viñas M, González-Casado A, Gómez-Sáez AM. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A* 2007; 1158: 33-46.
- Danopoulos E, Jenner LC, Twiddy M, Rotchell JM. Microplastic contamination of seafood intended for human consumption: a systematic review and meta-analysis. *Environmental health perspectives* 2020; 128: 126002.
- David A, Fenet H, Gomez E. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Pollution Bulletin* 2009; 58: 953-960.
- Davidson K, Dudas SE. Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2016; 71: 147-156.
- Davidson MG, Furlong RA, McManus MC. Developments in the life cycle assessment of chemical recycling of plastic waste—A review. *Journal of Cleaner Production* 2021; 293: 126163.
- de Boer J, Wester PG, Klamer HJC, Lewis WE, Boon JP. Do flame retardants threaten ocean life? *Nature* 1998; 394: 28-29.
- de Kock L, Sadan Z, Arp R, Upadhyaya P. A circular economy response to plastic pollution: Current policy landscape and consumer perception. *South African Journal of Science* 2020; 116: 1-2.
- De Mendiburu F. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>

- de Oliveira JPJ, Estrela FN, Rodrigues ASdL, Guimarães ATB, Rocha TL, Malafaia G. Behavioral and biochemical consequences of *Danio rerio* larvae exposure to polylactic acid bioplastic. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 404: 124152.
- de Sá LC, Luís LG, Guilhermino L. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution* 2015; 196: 359-362.
- de Sá LC, Oliveira M, Ribeiro F, Rocha TL, Futter MN. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of The Total Environment* 2018; 645: 1029-1039.
- de Wit CA, Herzke D, Vorkamp K. Brominated flame retardants in the Arctic environment—trends and new candidates. *Science of the Total Environment* 2010; 408: 2885-2918.
- De Witte B, Devriese L, Bekaert K, Hoffman S, Vandermeersch G, Cooreman K, et al. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine pollution bulletin* 2014; 85: 146-155.
- Dekiff JH, Remy D, Klasmeier J, Fries E. Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. *Environ Pollut* 2014; 186: 248-56.
- Denberg M, Mosbæk H, Hassager O, Arvin E. Determination of the concentration profile and homogeneity of antioxidants and degradation products in a cross-linked polyethylene type A (PEXa) pipe. *Polymer Testing* 2009; 28: 378-385.
- Deng Y, Zhang Y, Lemos B, Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports* 2017; 7: 1-10.
- Deng Y, Zhang Y, Qiao R, Bonilla MM, Yang X, Ren H, et al. Evidence that microplastics aggravate the toxicity of organophosphorus flame retardants in mice (*Mus musculus*). *Journal of Hazardous Materials* 2018; 357: 348-354.
- Derenne S, Quéneá K. Analytical pyrolysis as a tool to probe soil organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2015; 111: 108-120.
- des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, Prétat V, Schneider Y-J, Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 25: 455-465.
- Devriese LI, Van der Meulen MD, Maes T, Bekaert K, Paul-Pont I, Frère L, et al. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Marine pollution bulletin* 2015; 98: 179-187.
- Di Natale MV, Carroccio SC, Dattilo S, Cocca M, Nicosia A, Torri M, et al. Polymer aging affects the bioavailability of microplastics-associated contaminants in sea urchin embryos. *Chemosphere* 2022; 309: 136720.
- Diepens NJ, Koelmans AA. Accumulation of Plastic Debris and Associated Contaminants in Aquatic Food Webs. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 8510-8520.
- Dong X, Liu X, Hou Q, Wang Z. From natural environment to animal tissues: A review of microplastics(nanoplastics) translocation and hazards studies. *Science of The Total Environment* 2023; 855: 158686.
- Dris R, Gasperi J, Saad M, Mirande C, Tassin B. Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Marine pollution bulletin* 2016; 104: 290-293.
- Dubaish F, Liebezeit G. Suspended Microplastics and Black Carbon Particles in the Jade System, Southern North Sea. *Water, Air, & Soil Pollution* 2013; 224: 1352.
- e Silva PPG, Nobre CR, Resaffe P, Pereira CDS, Gusmão F. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. *Water research* 2016; 106: 364-370.
- Earth Watch. Plastic pollution, Consulté le: 21/07/2022, <https://earthwatch.org.uk/old-plastic-pollution>. EarthWatch institute

- ECHA. Risk assessment report on 1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DI-C8-10-BRANCHED ALKYL ESTERS, C9-RICH and DI-"ISONONYL" PHTHALATE (DINP) Agency EC. 2003. <https://echa.europa.eu/documents/10162/8fa0a07f-ec2a-4da6-bbe8-5b5e071b5c16>
- ECHA. Agreement of the Member State Committee on the identification of 4, 4'-isopropylidenediphenol (bisphenol A) as a substance of very high concern. 2017. Available on: <https://echa.europa.eu/documents/10162/81862f4e-92bc-6f64-9a01-42565b526022>.
- ECHA. Mapping exercise – Plastic additives initiative, Consulté le: 2020/07/02, <https://echa.europa.eu/fr/mapping-exercise-plastic-additives-initiative>,
- ECHA. Substance information on 2,2,4,4-tetramethyl-7-oxa-3,20-diazadispiro[5.1.11.2]-hencosan-21-one, Consulté le: 27/08/2022, <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.058.873>,
- EFSA. Scientific Opinion of the Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) on 25th list of substances for food contact materials. 7, 2009, pp. 1196-1202.
- EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. Efsa Journal 2016; 14: e04501.
- EFSA, Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Chesson A, Cocconcelli PS, et al. Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids, Review and priority setting for substances that are listed without a specific migration limit in Table 1 of Annex 1 of Regulation 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. EFSA Journal 2020; 18: e06124.
- Eganhouse RP, Pontolillo J, Gaines RB, Frysinger GS, Gabriel FLP, Kohler H-PE, et al. Isomer-Specific Determination of 4-Nonylphenols Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. Environmental Science & Technology 2009; 43: 9306-9313.
- Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertil Steril 2015; 103: 11-21.
- Ema M, Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E. Repeated-dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3', 5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. Drug and chemical toxicology 2008; 31: 399-412.
- Emballages magazines, Nathalie Gontard, Stéphane Bruzard, Jean-François Ghiglione. Rapport d'information : Les bioplastiques biodégradables et compostables - état des lieux magazines E. 2019. <https://www.emballagesmagazine.com/mediatheque/2/9/0/000035092.pdf>
- Engler RE. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environmental science & technology 2012; 46: 12302-12315.
- Espejo R, Valter K, Simona M, Janin Y, Arrizabalaga P. Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disruptors in Geneva municipal sewage wastewater. Journal of Chromatography A 2002; 976: 335-343.
- European Bioplastics. Bioplastic market data 2016 - Global production capacities of bioplastics 2016 - 2021. 2016.
- European Bioplastics. What are bioplastics? Material types, terminology, and labels – an introduction. bioplastics E. 2018. [https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP\\_FS\\_What\\_are\\_bioplastics.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf)
- European Bioplastics. Bioplastics market data, Consulté le: 10 July 2022, <https://www.european-bioplastics.org/market/>,
- European chemical agency. Mapping exercise – Plastic additives initiative, Consulté le: 2020/07/02, <https://echa.europa.eu/fr/mapping-exercise-plastic-additives-initiative>,
- European Commission. Directive 2003/11/CE du PARLEMENT EUROPÉEN et du conseil du 6 février 2003 portant vingt-quatrième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil relative à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (pentabromodiphényléther, octabromodiphényléther. Journal officiel de l'Union Européenne. 2003a. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0011&from=de>.

- European Commission. European Union Risk Assessment Report on 1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DI-C8-10-BRANCHED ALKYL ESTERS, C9-RICH AND DI-ISONONYL PHTHALATE (DINP) 2003b. <https://echa.europa.eu/documents/10162/83a55967-64a9-43cd-a0fa-d3f2d3c4938d>
- European Commission. Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. Journal officiel de l'Union Européenne. 2004. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02004R1935-20090807&from=EN>.
- European Commission. Directive 2005/84/EC of the European Parliament and of the council of 14 December 2005 amending for the 22nd time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles). Journal officiel de l'Union Européenne. 2005a. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:344:0040:0043:en:PDF>.
- European commission. 'Synoptic Document'. Provisional list of monomers and additives notified to European Commission as substances which may be used in the manufacture of plastics and coatings intended to come into contact with foodstuffs. (updated to June 2005). . SANCO D3/AS D(2005). 2005b. Available on: [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/documents\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/documents_en.htm).
- European Commission. Recommandation de la commission du 11 avril 2006 concernant des mesures de réduction des risques pour les substances: phtalate de dibutyle; 3,4-dichloroaniline; phtalate de di-«isodécyle»; acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dialkyles ramifiés en C9-11, riches en C10; phtalate de di-«isononyle»; acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dialkyles ramifiés en C8-10, riches en C9; éthylènediaminetétraacétate; acétate de méthyle; acide chloracétique; n-pentane; éthylènediaminetétraacétate de tétrasodium. Journal officiel de l'Union Européenne. 2006. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:104:0045:0047:FR:PDF>.
- European Commission. Règlement (CE) No 1223/2009 du parlement Européen du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. Journal officiel de l'Union Européenne. 2009. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009R1223&from=EN>.
- European Commission. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Journal officiel de l'Union Européenne. 2011a. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>.
- European Commission. Commission Regulation (EU) No 143/2011 of 17 February 2011 amending Annex XIV to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Journal officiel de l'Union Européenne. 2011b. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:044:0002:0006:en:PDF>.
- European Commission. Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official journal of European Union 2011c: 1-89.
- European Commission. A European Strategy for Plastics in a Circular Economy. Journal officiel de l'Union Européenne. 2018a. Available on: <https://ec.europa.eu/environment/pdf/circular-economy/plastics-strategy-annex.pdf>.
- European Commission. RÈGLEMENT (UE) 2018/213 DE LA COMMISSION du 12 février 2018 relatif à l'utilisation du bisphénol A dans les vernis et les revêtements destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et modifiant le règlement (UE) no 10/2011 en ce qui concerne l'utilisation de cette substance dans les matériaux en matière plastique entrant en contact avec des denrées alimentaires. Journal officiel de l'Union Européenne. 2018b. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0213&from=EL>.
- European Commission. RÈGLEMENT (UE) 2018/2005 DE LA COMMISSION du 17 décembre 2018 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP), le phtalate de dibutyle (DBP), le phtalate de benzyle et de butyle (BBP) et le phtalate de diisobutyle (DIBP) Journal officiel de l'Union Européenne. 2018c. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R2005&from=FR>.

- European Commission. Directive (UE) 2019/904 du Parlement européen et du conseil du du 5 juin 2019 relative à la réduction de l'incidence de certains produits en plastique sur l'environnement. 2019.
- European Commission. Chemicals Strategy for Sustainability Towards a Toxic-Free Environment - Communication octobre 2020/667 final. Journal officiel de l'Union Européenne. 2020. Available on: <https://ec.europa.eu/environment/pdf/chemicals/2020/10/Strategy.pdf>.
- European Commission. Annexe XVII REACH - RESTRICTIONS APPLICABLES À LA FABRICATION, À LA MISE SUR LE MARCHÉ ET À L'UTILISATION DE CERTAINES SUBSTANCES DANGEREUSES ET DE CERTAINS MÉLANGES ET ARTICLES DANGEREUX. Journal officiel de l'Union Européenne. 2021. Available on: [https://reach-info.ineris.fr/sites/reach-info.gesreg.fr/files/reglement/222\\_pdfsam\\_1\\_reach\\_annexe\\_xvii\\_oct\\_2021.pdf](https://reach-info.ineris.fr/sites/reach-info.gesreg.fr/files/reglement/222_pdfsam_1_reach_annexe_xvii_oct_2021.pdf).
- European Commission. Restriction roadmap under the chemicals strategy for sustainability, Commission staff working document, SWD(2022) 128 final. Journal officiel de l'Union Européenne 2022.
- European Flame Retardants Association. EFRA, Flame Retardants - Frequently Asked Questions. 2007. [https://www.flameretardants-online.com/images/itempics/2/9/1/item\\_18192\\_pdf\\_1.pdf](https://www.flameretardants-online.com/images/itempics/2/9/1/item_18192_pdf_1.pdf)
- Eurostat. Chemicals production and consumption statistics, Consulté le: 18/07/2022, <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/SEPDF/cache/50028.pdf>,
- Fabioux C. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Université de Bretagne occidentale-Brest, 2004.
- FAO. Fishery Statistical Collections - Consumption of Fish and Fishery Products. FAOSTAT - Food Balance Sheets, Consulté le: 14/08/2022, <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-consumption/en.Food> and Agriculture Organization of the United Nations
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020, 2020b.
- FAO. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2022: 294.
- Farrell P, Nelson K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environmental Pollution 2013; 177: 1-3.
- Fasano E, Bono-Blay F, Cirillo T, Montuori P, Lacorte S. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di (2-ethylhexyl) adipate from food packaging. Food control 2012; 27: 132-138.
- Faure F, Saini C, Potter G, Galgani F, De Alencastro LF, Hagemann P. An evaluation of surface micro- and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea. Environmental Science and Pollution Research 2015; 22: 12190-12197.
- Fauvelle V, Garel M, Tamburini C, Nerini D, Castro-Jiménez J, Schmidt N, et al. Organic additive release from plastic to seawater is lower under deep-sea conditions. Nature Communications 2021; 12: 4426.
- FDA. Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances (Chemistry Recommendations). 2007. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-preparation-premarket-submissions-food-contact-substances-chemistry>
- Fent K, Zenker A, Rapp M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. Environmental Pollution 2010; 158: 1817-1824.
- Ferrara F, Ademollo N, Delise M, Fabietti F, Funari E. Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. Chemosphere 2008; 72: 1279-1285.
- Fields P, Allen S, Korunic Z, McLaughlin A, Stathers T. Standardised testing for diatomaceous earth. CABI Publishing, pp. 779-784.
- Fikarová K, Cocovi-Solberg DJ, Rosende M, Horstkotte B, Sklenářová H, Miró M. A flow-based platform hyphenated to on-line liquid chromatography for automatic leaching tests of chemical additives from microplastics into seawater. Journal of Chromatography A 2019; 1602: 160-167.
- Fischer M, Scholz-Bottcher BM. Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Environ Sci Technol 2017; 51: 5052-5060.



- Flameretardants-online. The flame retardants market, Consulté le: 19/09/2022, <https://flameretardants-online.com/flame-retardants/market>,
- Fossi MC, Coppola D, Bainsi M, Giannetti M, Guerranti C, Marsili L, et al. Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine Environmental Research* 2014; 100: 17-24.
- Fossi MC, Marsili L, Bainsi M, Giannetti M, Coppola D, Guerranti C, et al. Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution* 2016; 209: 68-78.
- Fournier E, Etienne-Mesmin L, Grootaert C, Jelsbak L, Syberg K, Blanquet-Diot S, et al. Microplastics in the human digestive environment: A focus on the potential and challenges facing in vitro gut model development. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 415: 125632.
- Fox J, Weisberg S, Price B, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, et al. Companion to Applied Regression. R package version 2022.
- FranceAgriMer. Pêche et aquaculture - fiche filière. FranceAgriMer éndpdlaedlm. 2022. <https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/68225/document/FICHE%20FILIERE%20PECHE%20AQUA%202022.pdf?version=4>
- Franzellitti S, Canesi L, Auguste M, Wathsala RHGR, Fabbri E. Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: A physiological perspective. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2019; 68: 37-51.
- Fred-Ahmadu OH, Bhagwat G, Oluyoye I, Benson NU, Ayejuyo OO, Palanisami T. Interaction of chemical contaminants with microplastics: principles and perspectives. *Science of the Total Environment* 2020; 706: 135978.
- Frederiksen M, Vorkamp K, Bossi R, Rigét F, Dam M, Svensmark B. Method development for simultaneous analysis of HBCD, TBBPA, and dimethyl-TBBPA in marine biota from Greenland and the Faroe Islands. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2007; 87: 1095-1109.
- Frère L, Maignien L, Chalopin M, Huvet A, Rinnert E, Morrison H, et al. Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. *Environmental Pollution* 2018; 242: 614-625.
- Fries E, Dekiff JH, Willmeyer J, Nuelle M-T, Ebert M, Remy D. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental science: processes & impacts* 2013; 15: 1949-1956.
- FrontierLab. Multi-functional Pyrolyzer® Technical Note PYA1-081E-Determination of Antioxidants (Irganox 1076 and Irganox 1010) in Polyethylene Using Thermal Desorption and Reactive Pyrolysis. Frontier Lab: 2.
- Gächter R, Müller H, Klemchuck P. Stabilizers, Processing Aids, Plasticizers, Fillers, Reinforcements, Colorants for Thermoplastics. *Plastics Additives Handbook—4th Edition*, Carl Hanser Verlag, Munich, Vienna, New York, Barcelona 1993.
- Gago-Ferrero P, Alonso MB, Bertozzi CP, Marigo J, Barbosa L, Cremer M, et al. First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environmental Science & Technology* 2013; 47: 5619-5625.
- Galloway TS. Micro-and nano-plastics and human health. Springer, Cham, 2015, pp. 343-366.
- Galmán Graño S, Sendón R, López Hernández J, Rodríguez-Bernaldo de Quiros A. GC-MS screening analysis for the identification of potential migrants in plastic and paper-based candy wrappers. *Polymers* 2018; 10: 802.
- Gandara ESPP, Nobre CR, Resaffe P, Pereira CDS, Gusmao F. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. *Water Res* 2016; 106: 364-370.
- Garde JA, Catala R, Gavara R. Global and specific migration of antioxidants from polypropylene films into food simulants. *J Food Prot* 1998; 61: 1000-6.
- Gardon T, Huvet A, Paul-Pont I, Cassone AL, Sham Koua M, Soyez C, et al. Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Water Res* 2020; 179: 115890.

- Gaspar TR, Chi RJ, Parrow MW, Ringwood AH. Cellular Bioreactivity of Micro- and Nano-Plastic Particles in Oysters. *Frontiers in Marine Science* 2018; 5.
- Gassel M, Harwani S, Park J-S, Jahn A. Detection of nonylphenol and persistent organic pollutants in fish from the North Pacific Central Gyre. *Marine pollution bulletin* 2013; 73: 231-242.
- Gauquie J, Devriese L, Robbens J, De Witte B. A qualitative screening and quantitative measurement of organic contaminants on different types of marine plastic debris. *Chemosphere* 2015; 138: 348-356.
- Gaylor MO, Harvey E, Hale RC. House crickets can accumulate polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) directly from polyurethane foam common in consumer products. *Chemosphere* 2012; 86: 500-505.
- Gayraud V, Lacroix MZ, Grandin FC, Collet SH, Mila H, Viguie C, et al. Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environ Health Perspect* 2019; 127: 77005.
- Gehring C, Welle F. Migration of Acetaldehyde Scavengers From PET Bottles. Elsevier, 2017.
- Gehring C, Welle F. Migration Testing of Polyethylene Terephthalate: Comparison of Regulated Test Conditions with Migration into Real Food at the End of Shelf Life. *Packaging Technology and Science* 2018; 31: 771-780.
- Gerigny O, Brun M, Tomasino C, Le Moigne M, Lacroix C, Kerambrun M, et al. Évaluation du descripteur 10 « Déchets marins » en France métropolitaine. Rapport scientifique pour l'évaluation 2018 au titre de la DCSSM. 2018.
- GESAMP. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment. 2015.
- Geueke B. Dossier - Bioplastics as food contact materials. *Food packaging forum* 2014.
- Geueke B, Wagner CC, Muncke J. Food contact substances and chemicals of concern: a comparison of inventories. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2014; 31: 1438-50.
- Gewert B, Plassmann M, Sandblom O, MacLeod M. Identification of Chain Scission Products Released to Water by Plastic Exposed to Ultraviolet Light. *Environmental Science & Technology Letters* 2018; 5: 272-276.
- Gewert B, Plassmann MM, MacLeod M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ Sci Process Impacts* 2015; 17: 1513-21.
- Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 2017; 3: e1700782.
- Gigault J, Ter Halle A, Baudrimont M, Pascal P-Y, Gauffre F, Phi T-L, et al. Current opinion: what is a nanoplastic? *Environmental pollution* 2018; 235: 1030-1034.
- Giger W, Gabriel FLP, Jonkers N, Wettstein FE, Kohler H-PE. Environmental fate of phenolic endocrine disruptors: field and laboratory studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2009; 367: 3941-3963.
- Gilbert M. *Plastics materials: Introduction and historical development*. Elsevier, 2017, pp. 1-18.
- Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio AF, Civade C, Brenier C, et al. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 949-950: 99-108.
- Godwin AD, Krauskopf LG. Monomeric plasticizers. *Handbook of vinyl formulating*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken 2008: 173-238.
- González-Vila FJ, Amblès A, del Río JC, L G. Characterisation and differentiation of kerogens by pyrolytic and chemical degradation techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2001; 58-59: 315-328.
- Gouin T, Roche N, Lohmann R, Hodges G. A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environmental Science & Technology* 2011; 45: 1466-1472.
- Graham ER, Thompson JT. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of experimental marine biology and ecology* 2009; 368: 22-29.

- Green DS, Boots B, Sigwart J, Jiang S, Rocha C. Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environmental Pollution* 2016; 208: 426-434.
- Gregory MR. Accumulation and distribution of virgin plastic granules on New Zealand beaches. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 1978; 12: 399-414.
- Groh KJ, Backhaus T, Carney-Almroth B, Geueke B, Inostroza PA, Lennquist A, et al. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of The Total Environment* 2019; 651: 3253-3268.
- Groh KJ, Geueke B, Muncke J. FCCdb: Food Contact Chemicals database. Version 5.0 (5.0) [Data set]. Zenodo., 2020.
- Groh KJ, Muncke J. In vitro toxicity testing of food contact materials: state-of-the-art and future challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2017; 16: 1123-1150.
- Gunaalan K, Fabbri E, Capolupo M. The hidden threat of plastic leachates: A critical review on their impacts on aquatic organisms. *Water Research* 2020; 184: 116170.
- Guo H, Zheng X, Luo X, Mai B. Leaching of brominated flame retardants (BFRs) from BFRs-incorporated plastics in digestive fluids and the influence of bird diets. *Journal of Hazardous Materials* 2020; 393: 122397.
- Guo H, Zheng X, Ru S, Luo X, Mai B. The leaching of additive-derived flame retardants (FRs) from plastics in avian digestive fluids: The significant risk of highly lipophilic FRs. *Journal of Environmental Sciences* 2019; 85: 200-207.
- Güven O, Gökdağ K, Jovanović B, Kideys AE. Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution* 2017; 223: 286-294.
- Hahladakis JN, Velis CA, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of hazardous materials* 2018; 344: 179-199.
- Halden RU. Plastics and health risks. *Annual review of public health* 2010; 31: 179-194.
- Hale RC, Seeley ME, La Guardia MJ, Mai L, Zeng EY. A global perspective on microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 2020; 125: e2018JC014719.
- Hamlin HJ, Marciano K, Downs CA. Migration of nonylphenol from food-grade plastic is toxic to the coral reef fish species *Pseudochromis fridmani*. *Chemosphere* 2015; 139: 223-228.
- Hammond M, Nunn H, Rogers G, Lee H, Marghitoiu A-L, Perez L, et al. Identification of a Leachable Compound Detrimental to Cell Growth in Single-Use Bioprocess Containers. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2013; 67: 123.
- Hana R, Stephen B, Richard J, Carol J. Toxicological profile for polybrominated diphenyl ethers Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Division of Toxicology. Toxicology Information Branch, Atlanta, Georgia 2004: 619.
- Hansen E, Nilsson NH, Lithner D, Lassen C. Hazardous substances in plastic materials. COWI in cooperation with Danish Technological Institute 2013: 7-8.
- Hantoro I, Löhr AJ, Van Belleghem FGJ, Widianarko B, Ragas AMJ. Microplastics in coastal areas and seafood: implications for food safety. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2019; 36: 674-711.
- Hartmann NB, Hüffer T, Thompson RC, Hassellöv M, Verschoor A, Daugaard AE, et al. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 1039-1047.
- Hashimoto K, Urakami K, Fujiwara Y, Terada S, Watanabe C. Determination of residual solvents in pharmaceuticals by thermal desorption-GC/MS. *Anal Sci* 2001; 17: 645-8.
- Havstad MR. Biodegradable plastics. Elsevier, 2020, pp. 97-129.

- He W, Qin N, Kong X, Liu W, He Q, Ouyang H, et al. Spatio-temporal distributions and the ecological and health risks of phthalate esters (PAEs) in the surface water of a large, shallow Chinese lake. *Science of the Total Environment* 2013; 461: 672-680.
- Henkel C, Hüffer T, Hofmann T. The leaching of phthalates from PVC can be determined with an infinite sink approach. *MethodsX* 2019; 6: 2729-2734.
- Heo NW, Hong SH, Han GM, Hong S, Lee J, Song YK, et al. Distribution of small plastic debris in cross-section and high strandline on Heungnam beach, South Korea. *Ocean Science Journal* 2013; 48: 225-233.
- Hermabessiere L. Les microplastiques et leurs additifs dans les produits de la pêche: développements méthodologiques et prévalence. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018.
- Hermabessiere L, Dehaut A, Paul-Pont I, Lacroix C, Jezequel R, Soudant P, et al. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere* 2017; 182: 781-793.
- Hermabessiere L, Himber C, Boricaud B, Kazour M, Amara R, Cassone AL, et al. Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. *Anal Bioanal Chem* 2018; 410: 6663-6676.
- Hermabessiere L, Receveur J, Himber C, Mazurais D, Huvet A, Lagarde F, et al. An Irgafos(R) 168 story: When the ubiquity of an additive prevents studying its leaching from plastics. *Sci Total Environ* 2020; 749: 141651.
- Hermabessiere L, Rochman CM. Microwave-Assisted Extraction for Quantification of Microplastics Using Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Environ Toxicol Chem* 2021; 40: 2733-2741.
- Herrera M, Matuschek G, Kettrup A. Fast identification of polymer additives by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2003; 70: 35-42.
- Herzke D, Anker-Nilssen T, Nøst TH, Götsch A, Christensen-Dalsgaard S, Langset M, et al. Negligible impact of ingested microplastics on tissue concentrations of persistent organic pollutants in northern fulmars off coastal Norway. *Environmental science & technology* 2016; 50: 1924-1933.
- Hipfner JM, Galbraith M, Tucker S, Studholme KR, Domalik AD, Pearson SF, et al. Two forage fishes as potential conduits for the vertical transfer of microfibrils in Northeastern Pacific Ocean food webs. *Environmental Pollution* 2018; 239: 215-222.
- Hirai H, Takada H, Ogata Y, Yamashita R, Mizukawa K, Saha M, et al. Organic micropollutants in marine plastic debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin* 2011; 62: 1683-1692.
- Hirt N, Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology* 2020; 17.
- His E, Beiras R, Seaman MNL. The Assessment of Marine Pollution - Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. In: Southward AJ, Tyler PA, Young CM, editors. 37. Academic Press, 1999, pp. 1-178.
- Hodges G, Carr E, Hazzard R, Carr K. Uptake and translocation of microparticles in small intestine. *Digestive diseases and sciences* 1995; 40: 967-975.
- Höfer R. Processing and performance additives for plastics. 2012.
- Hoornweg D, Bhada-Tata P, Kennedy C. Environment: Waste production must peak this century. *Nature* 2013; 502: 615-617.
- Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, Lahive E, Svendsen C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of The Total Environment* 2017; 586: 127-141.
- Hosaka A, Watanabe A, Watanabe C, Teramae N, Ohtani H. Polymer-coated sample cup for quantitative analysis of semi-volatile phthalates in polymeric materials by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2015; 1391: 88-92.
- Hosaka A, Watanabe C, Tsuge S. Rapid Determination of Decabromodiphenyl Ether in Polystyrene by Thermal Desorption-GC/MS. *Analytical Sciences* 2005; 21: 1145-1147.

- Huang W, Song B, Liang J, Niu Q, Zeng G, Shen M, et al. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 405: 124187.
- Hussain N, Jani PU, Florence AT. Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat. *Pharmaceutical research* 1997; 14: 613-618.
- IEC IEC-. IEC 62321-8 - Determination of certain substances in electrotechnical products - Part 8: Phthalates in polymers by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-mass spectrometry using a pyrolyzer/thermal desorption accessory (Py/TD-GC-MS). 2017.
- INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Bisphénols F et S, DRC-14-136881-02238A. 2014.
- Iñiguez ME, Conesa JA, Fullana A. Marine debris occurrence and treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2016; 64: 394-402.
- Iñiguez ME, Conesa JA, Fullana A. Microplastics in Spanish table salt. *Scientific reports* 2017; 7: 1-7.
- International Electrotechnical Commission. IEC 62321-8 - Determination of certain substances in electrotechnical products - Part 8: Phthalates in polymers by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-mass spectrometry using a pyrolyzer/thermal desorption accessory (Py/TD-GC-MS). 2017. <http://mapnamagz.yabesh.ir/std/handle/yse/233172>
- ISO. Qualité de l'eau. Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryonnaire-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*). Organisation Internationale de Normalisation 2015.
- Isobe A, Azuma T, Cordova MR, Cózar A, Galgani F, Hagita R, et al. A multilevel dataset of microplastic abundance in the world's upper ocean and the Laurentian Great Lakes. *Microplastics and Nanoplastics* 2021; 1: 16.
- Isobe T, Takada H, Kanai M, Tsutsumi S, Isobe KO, Boonyatumanond R, et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environmental Monitoring and Assessment* 2007; 135: 423-440.
- İyigünoğdu İ, Üstündağ A, Duydu Y. Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020; 17: 457.
- Jabeen N, Majid I, Nayik GA. Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Food & Agriculture* 2015; 1: 1117749.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 2015; 347: 768-771.
- Jang M, Shim WJ, Han GM, Cho Y, Moon Y, Hong SH. Relative importance of aqueous leachate versus particle ingestion as uptake routes for microplastic additives (hexabromocyclododecane) to mussels. *Environmental Pollution* 2021; 270: 116272.
- Jang M, Shim WJ, Han GM, Rani M, Song YK, Hong SH. Styrofoam debris as a source of hazardous additives for marine organisms. *Environmental science & technology* 2016; 50: 4951-4960.
- Jansson KD, Zawodny CP, Wampler TP. Determination of polymer additives using analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2007; 79: 353-361.
- Jeknavorian AA, Mabud MA, Barry EF, Litzau JJ. Novel pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometric techniques for the characterization of chemical additives in portland cement and concrete. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 1998; 46: 85-100.
- Jiang T, Sun H, Deng X. Chapter 4 - Reserves estimation methods of fractured vuggy carbonate gas reservoirs. In: Jiang T, Sun H, Deng X, editors. Gulf Professional Publishing, 2019, pp. 135-231.
- Johansson I, Héas-Moisan K, Guiot N, Munsch C, Tronczyński J. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels from selected French coastal sites: 1981-2003. *Chemosphere* 2006; 64: 296-305.
- Johnson Jr W. Final report on the safety assessment of acetyl triethyl citrate, acetyl tributyl citrate, acetyl trihexyl citrate, and acetyl trioctyl citrate. *International journal of toxicology* 2002; 21: 1-17.

- Journal officiel. LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A (1). Journal officiel de la République Française. 2012. Available on: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000026830015>.
- Journal officiel. JORF n°0297 du 22 décembre 2016, Vocabulaire des matériaux et de l'environnement (liste de termes, expressions et définitions adoptés). Journal Officiel de la République Française, 2016.
- Journal officiel. Décret n° 2017-291 du 6 mars 2017 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'interdiction de mise sur le marché des produits cosmétiques rincés à usage d'exfoliation ou de nettoyage comportant des particules plastiques solides et des bâtonnets ouatés à usage domestique dont la tige est en plastique. Journal officiel de la République Française. 2017. Available on: [www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000034154540&categorieLien=id](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000034154540&categorieLien=id), Accédé le: 20/03/2018.
- Journal officiel. LOI n° 2018-938 du 30 octobre 2018 pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous - EGAlim 2018-938. Journal officiel de la République Française. 2018. Available on: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000037547946/>.
- Journal officiel. Loi AGECE - LOI No 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire, stratégies de gestion et de prévention de la production de déchets. Journal officiel de la République Française. 2020. Available on: <https://www.legifrance.gouv.fr/download/pdf?id=tIvInK1-pPYKGFzbZJvgnB0La5rYk6ys5dm FwTPZs=>.
- Kamrin MA. Phthalate risks, phthalate regulation, and public health: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2009; 12: 157-174.
- Kang Y, Den W, Bai H, Ko F-H. Direct quantitative analysis of phthalate esters as micro-contaminants in cleanroom air and wafer surfaces by auto-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2005; 1070: 137-145.
- Karamanlioglu M, Preziosi R, Robson GD. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly (lactic acid): A review. *Polymer Degradation and stability* 2017; 137: 122-130.
- Karami A, Golieskardi A, Keong Choo C, Larat V, Galloway TS, Salamatinia B. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Scientific Reports* 2017; 7: 1-11.
- Karapanagioti HK, Klontza I. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesbos island beaches (Greece). *Marine Environmental Research* 2008; 65: 283-290.
- Kato LS, Conte-Junior CA. Safety of Plastic Food Packaging: The Challenges about Non-Intentionally Added Substances (NIAS) Discovery, Identification and Risk Assessment. *Polymers (Basel)* 2021; 13.
- Kawamura Y, Ogawa Y, Nishimura T, Kikuchi Y, Nishikawa J-i, Nishihara T, et al. Estrogenic activities of UV stabilizers used in food contact plastics and benzophenone derivatives tested by the yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science* 2003; 49: 205-212.
- Ke A-Y, Chen J, Zhu J, Wang Y-H, Hu Y, Fan Z-L, et al. Impacts of leachates from single-use polyethylene plastic bags on the early development of clam *Meretrix meretrix* (Bivalvia: Veneridae). *Marine Pollution Bulletin* 2019; 142: 54-57.
- Kedzierski M, D'Almeida M, Magueresse A, Le Grand A, Duval H, César G, et al. Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. *Marine Pollution Bulletin* 2018; 127: 684-694.
- Kedzierski M, Lechat B, Sire O, Le Maguer G, Le Tilly V, Bruzard S. Microplastic contamination of packaged meat: Occurrence and associated risks. *Food Packaging and Shelf Life* 2020; 24.
- Kenyon KW, Kridler E. Laysan Albatrosses swallow indigestible matter. *The Auk* 1969; 86: 339-343.
- Khaled A, Rivaton A, Richard C, Jaber F, Sleiman M. Phototransformation of Plastic Containing Brominated Flame Retardants: Enhanced Fragmentation and Release of Photoproducts to Water and Air. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 11123-11131.

- Khan B, Bilal Khan Niazi M, Samin G, Jahan Z. Thermoplastic starch: A possible biodegradable food packaging material—A review. *Journal of Food Process Engineering* 2017; 40: e12447.
- Kim J-W, Ramaswamy BR, Chang K-H, Isobe T, Tanabe S. Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 3511-3520.
- Kim JW, Kim YM, Moon HM, Hosaka A, Watanabe C, Teramae N, et al. Comparative study of thermal desorption and solvent extraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis for the quantification of phthalates in polymers. *J Chromatogr A* 2016; 1451: 33-40.
- Kim YM, Kim JW, Moon HM, Lee MJ, Hosaka A, Watanabe A, et al. Rapid Quantification of N-Methyl-2-pyrrolidone in Polymer Matrices by Thermal Desorption-GC/MS. *Anal Sci* 2017; 33: 821-824.
- Kirstein IV, Kirmizi S, Wichels A, Garin-Fernandez A, Erler R, Löder M, et al. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research* 2016; 120: 1-8.
- Klein K, Hof D, Dombrowski A, Schweyen P, Dierkes G, Ternes T, et al. Enhanced in vitro toxicity of plastic leachates after UV irradiation. *Water Research* 2021; 199: 117203.
- Kleine-Benne E, Rose B. Versatile Automated Pyrolysis GC Combining a Filament Type Pyrolyzer with a Thermal Desorption Unit, Consulté le: 2020/07/02, <http://www.gerstel.de/pdf/p-gc-an-2011-04.pdf>, Gerstel Application Note
- Koelmans AA, Bakir A, Burton GA, Janssen CR. Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental science & technology* 2016; 50: 3315-3326.
- Koelmans AA, Besseling E, Foekema EM. Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental pollution* 2014; 187: 49-54.
- Koelmans AA, Besseling E, Wegner A, Foekema EM. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: a model analysis. *Environmental science & technology* 2013; 47: 7812-7820.
- Kojima H, Takeuchi S, Itoh T, Iida M, Kobayashi S, Yoshida T. In vitro endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. *Toxicology* 2013; 314: 76-83.
- Kolahgar B, Pfannkoch E. The use of different PTV inlet liner types for trapping alkanes, aromatics and oxygenated compounds during thermal desorption, Consulté le: 22/08/2022, [https://www.gerstelus.com/wp-content/uploads/2017/07/technote-2002-03\\_cis-liner-type.pdf](https://www.gerstelus.com/wp-content/uploads/2017/07/technote-2002-03_cis-liner-type.pdf),
- Kolomijeca A, Parrott J, Khan H, Shires K, Clarence S, Sullivan C, et al. Increased Temperature and Turbulence Alter the Effects of Leachates from Tire Particles on Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology* 2020; 54: 1750-1759.
- Kudo Y, Obayashi K, Yanagisawa H, Maruyama F, Fujimaki S, Miyagawa H, et al. Development of a screening method for phthalate esters in polymers using a quantitative database in combination with pyrolyzer/thermal desorption gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2019; 1602: 441-449.
- Kumar M, Chen H, Sarsaiya S, Qin S, Liu H, Awasthi MK, et al. Current research trends on micro- and nano-plastics as an emerging threat to global environment: A review. *J Hazard Mater* 2021; 409: 124967.
- Kwan CS, Takada H. Release of additives and monomers from plastic wastes. *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment* 2016: 51-70.
- La Farre M, Pérez S, Kantiani L, Barceló D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2008; 27: 991-1007.
- La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental science & technology* 2006; 40: 6247-6254.

- La Nasa J, Biale G, Ferriani B, Colombini MP, Modugno F. A pyrolysis approach for characterizing and assessing degradation of polyurethane foam in cultural heritage objects. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2018; 134: 562-572.
- La Nasa J, Biale G, Ferriani B, Trevisan R, Colombini MP, Modugno F. *Plastics in Heritage Science: Analytical Pyrolysis Techniques Applied to Objects of Design*. *Molecules* 2020; 25.
- La Nasa J, Biale G, Mattonai M, Modugno F. Microwave-assisted solvent extraction and double-shot analytical pyrolysis for the quali-quantitation of plasticizers and microplastics in beach sand samples. *J Hazard Mater* 2021; 401: 123287.
- La Nasa J, Biale G, Sabatini F, Degano I, Colombini MP, Modugno F. Synthetic materials in art: a new comprehensive approach for the characterization of multi-material artworks by analytical pyrolysis. *Heritage Science* 2019; 7.
- Lacroix C, Le Cuff N, Receveur J, Moraga D, Auffret M, Guyomarch J. Development of an innovative and "green" stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J Chromatogr A* 2014; 1349: 1-10.
- Lagarde F, Olivier O, Zanella M, Daniel P, Hiard S, Caruso A. Microplastic interactions with freshwater microalgae: hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environmental pollution* 2016; 215: 331-339.
- Lahimer MC, Ayed N, Horriche J, Belgaied S. Characterization of plastic packaging additives: food contact, stability and toxicity. *Arabian journal of chemistry* 2017; 10: S1938-S1954.
- Lai DY, Kacew S, Dekant W. Tetrabromobisphenol A (TBBPA): Possible modes of action of toxicity and carcinogenicity in rodents. *Food and Chemical Toxicology* 2015; 80: 206-214.
- Laing LV, Viana J, Dempster EL, Trznadel M, Trunkfield LA, Uren Webster TM, et al. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics* 2016; 11: 526-38.
- Lambert S, Wagner M. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere* 2016; 161: 510-517.
- Lambert S, Wagner M. Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chemical Society Reviews* 2017; 46: 6855-6871.
- Lapointe R. *Bioplastiques biodégradables, compostables et biosourcés pour les emballages alimentaires, distinctions subtiles mais significatives*. Université de Sherbrooke., 2012.
- Lattimer RP, Harris RE. Mass spectrometry for analysis of additives in polymers. *Mass Spectrometry Reviews* 1985; 4: 369-390.
- Lau O-W, Wong S-K. Contamination in food from packaging material. *Journal of chromatography A* 2000; 882: 255-270.
- Lau WWY, Shiran Y, Bailey RM, Cook E, Stuchtey MR, Koskella J, et al. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science* 2020; 369: 1455-1461.
- Lee H, Kunz A, Shim WJ, Walther BA. Microplastic contamination of table salts from Taiwan, including a global review. *Scientific Reports* 2019; 9: 10145.
- Lee HJ, Kim GB. An overview of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the marine environment. *Ocean Science Journal* 2015; 50: 119-142.
- Lee K-W, Shim WJ, Kwon OY, Kang J-H. Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Science & Technology* 2013; 47: 11278-11283.
- Lee PJ, Gioia AJD. RAPID ANALYSIS OF 25 COMMON POLYMER ADDITIVES. Corporation W. 2008. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002488en.pdf>
- Lenz R, Enders K, Nielsen TG. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113: E4121-E4122.



- León VM, García-Agüera I, Moltó V, Fernández-González V, Llorca-Pérez L, Andrade JM, et al. PAHs, pesticides, personal care products and plastic additives in plastic debris from Spanish Mediterranean beaches. *Science of the total environment* 2019; 670: 672-684.
- León VM, García I, González E, Samper R, Fernández-González V, Muniategui-Lorenzo S. Potential transfer of organic pollutants from littoral plastics debris to the marine environment. *Environmental Pollution* 2018; 236: 442-453.
- Leslie H, Depledge M. Where is the evidence that human exposure to microplastics is safe? *Environment International* 2020; 142: 105807.
- Leslie HA, Brandsma SH, van Velzen MJM, Vethaak AD. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International* 2017; 101: 133-142.
- Leslie HA, van Velzen MJM, Brandsma SH, Vethaak AD, Garcia-Vallejo JJ, Lamoree MH. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International* 2022; 163: 107199.
- Li B, Wang Z-W, Lin Q-B, Hu C-Y, Su Q-Z, Wu Y-M. Determination of Polymer Additives-Antioxidants, Ultraviolet Stabilizers, Plasticizers and Photoinitiators in Plastic Food Package by Accelerated Solvent Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 2015; 53: 1026-1035.
- Li C, Jin F, Snyder SA. Recent advancements and future trends in analysis of nonylphenol ethoxylates and their degradation product nonylphenol in food and environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018; 107: 78-90.
- Li H-X, Getzinger GJ, Ferguson PL, Orihuela B, Zhu M, Rittschof D. Effects of Toxic Leachate from Commercial Plastics on Larval Survival and Settlement of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Environmental Science & Technology* 2016; 50: 924-931.
- Li H, Aguirre-Villegas HA, Allen RD, Bai X, Benson CH, Beckham GT, et al. Expanding Plastics Recycling Technologies: Chemical Aspects, Technology Status and Challenges. *Green Chemistry* 2022.
- Li H, Su G, Zou M, Yu L, Letcher RJ, Yu H, et al. Effects of tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate on growth, reproduction, and gene transcription of *Daphnia magna* at environmentally relevant concentrations. *Environmental science & technology* 2015; 49: 12975-12983.
- Li J, Qu X, Su L, Zhang W, Yang D, Kolandhasamy P, et al. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental pollution* 2016; 214: 177-184.
- Li J, Yang D, Li L, Jabeen K, Shi H. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental pollution* 2015; 207: 190-195.
- Liboiron M, Liboiron F, Wells E, Richárd N, Zahara A, Mather C, et al. Low plastic ingestion rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland destined for human consumption collected through citizen science methods. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 113: 428-437.
- Lichtenstein N, Quellmalz K. Analyse von 2,6-Di-tert.butyl-p-kresol in Butadien/Styrol-Copolymeren durch Curie-Punkt-Pyrolyse/GC/MS. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 1983; 316: 268-270.
- Liebezeit G, Liebezeit E. Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2013; 30: 2136-2140.
- Liebezeit G, Liebezeit E. Synthetic particles as contaminants in German beers. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2014; 31: 1574-1578.
- Lithner D, Damberg J, Dave G, Larsson Å. Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2009; 74: 1195-1200.
- Lithner D, Larsson Å, Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment* 2011; 409: 3309-3324.
- Lithner D, Nordensvan I, Dave G. Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research* 2012; 19: 1763-1772.

- Liu A-f, Qu G-b, Yu M, Liu Y-w, Shi J-b, Jiang G-b. Tetrabromobisphenol-A/S and nine novel analogs in biological samples from the Chinese Bohai Sea: implications for trophic transfer. *Environmental science & technology* 2016; 50: 4203-4211.
- Liu H, Liu K, Fu H, Ji R, Qu X. Sunlight mediated cadmium release from colored microplastics containing cadmium pigment in aqueous phase. *Environmental Pollution* 2020; 263: 114484.
- Liu HC, Den W, Chan SF, Kin KT. Analysis of trace contamination of phthalate esters in ultrapure water using a modified solid-phase extraction procedure and automated thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008; 1188: 286-94.
- Liu X, Shi H, Xie B, Dionysiou DD, Zhao Y. Microplastics as Both a Sink and a Source of Bisphenol A in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 10188-10196.
- Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Jimenez-Morillo NT, Gonzalez-Vila FJ, Guillamon E, Bermudez JM, et al. Pyrolysis-gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry for monitoring natural additives in polylactic acid active food packages. *J Chromatogr A* 2017; 1525: 145-151.
- Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 2002; 61: 123-130.
- Long M, Moriceau B, Gallinari M, Lambert C, Huvet A, Raffray J, et al. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates. *Marine Chemistry* 2015; 175: 39-46.
- Loyo-Rosales JE, Rosales-Rivera GC, Lynch AM, Rice CP, Torrents A. Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 2016-2020.
- Luo H, Liu C, He D, Sun J, Li J, Pan X. Effects of aging on environmental behavior of plastic additives: Migration, leaching, and ecotoxicity. *Science of The Total Environment* 2022; 849: 157951.
- Luo H, Xiang Y, He D, Li Y, Zhao Y, Wang S, et al. Leaching behavior of fluorescent additives from microplastics and the toxicity of leachate to *Chlorella vulgaris*. *Science of The Total Environment* 2019; 678: 1-9.
- Luo H, Zhao Y, Li Y, Xiang Y, He D, Pan X. Aging of microplastics affects their surface properties, thermal decomposition, additives leaching and interactions in simulated fluids. *Science of The Total Environment* 2020; 714: 136862.
- Lusher A, Hollman P, Mendoza-Hill J. Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety: FAO, 2017.
- Lusher A, Welden N, Sobral P, Cole M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. CRC Press, 2020, pp. 119-148.
- Lynch JM, Knauer K, Shaw KR. Plastic Additives in the Ocean. *Plastics and the Ocean: Origin, Characterization, Fate, and Impacts* 2022: 43-76.
- Mackintosh CE, Maldonado J, Hongwu J, Hoover N, Chong A, Ikononou MG, et al. Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Environmental science & technology* 2004; 38: 2011-2020.
- Maia J, Cruz J, Sendón R, Bustos J, Sanchez J, Paseiro P. Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International* 2009; 42: 1410-1414.
- Malafaia G, Nascimento ÍF, Estrela FN, Guimarães ATB, Ribeiro F, Luz TMD, et al. Green toxicology approach involving polylactic acid biomicroplastics and neotropical tadpoles: (Eco)toxicological safety or environmental hazard? *Science of The Total Environment* 2021; 783: 146994.
- Manabe N, Toyoda T, Yokota Y. Determination of a hindered phenol-type antioxidant by pyrolysis-GC/MS in the presence of tetramethyl ammonium hydroxide. *Bunseki kagaku* 1999; 48: 449-456.
- Maragou NC, Makri A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008; 25: 373-83.

- Markey CM, Luque EH, Munoz de Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biology of reproduction* 2001; 65: 1215-1223.
- Martinez-Gomez C, Leon VM, Calles S, Gomariz-Olcina M, Vethaak AD. The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins. *Mar Environ Res* 2017; 130: 69-76.
- Maruyama F, Fujimaki S, Sakamoto Y, Kudo Y, Miyagawa H. Screening of phthalates in polymer materials by pyrolysis GC/MS. *Anal Sci* 2015; 31: 3-5.
- Mathalon A, Hill P. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine pollution bulletin* 2014; 81: 69-79.
- Mato Y, Isobe T, Takada H, Kanehiro H, Ohtake C, Kaminuma T. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ Sci Technol* 2001; 35: 318-24.
- McCormick A, Hoellein TJ, Mason SA, Schlupe J, Kelly JJ. Microplastic is an Abundant and Distinct Microbial Habitat in an Urban River. *Environmental Science & Technology* 2014; 48: 11863-11871.
- Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* 2009; 364: 2097-2113.
- Meeker JD, Stapleton HM. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 318-23.
- Miller D, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP. Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay. *Environmental health perspectives* 2001; 109: 133-138.
- Mottier A, Kientz-Bouchart V, Serpentine A, Lebel JM, Jha AN, Costil K. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 2013; 128-129: 67-78.
- Muncke J. Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: an updated review of exposure, effect and risk assessment. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2011; 127: 118-127.
- Muncke J, Andersson A-M, Backhaus T, Boucher JM, Carney Almroth B, Castillo Castillo A, et al. Impacts of food contact chemicals on human health: a consensus statement. *Environmental Health* 2020; 19: 1-12.
- Muncke J, Andersson AM, Backhaus T, Boucher JM, Carney Almroth B, Castillo Castillo A, et al. Impacts of food contact chemicals on human health: a consensus statement. *Environ Health* 2020; 19: 25.
- Muncke J, Backhaus T, Geueke B, Maffini Maricel V, Martin Olwenn V, Myers John P, et al. Scientific Challenges in the Risk Assessment of Food Contact Materials. *Environmental Health Perspectives* 2017; 125: 095001.
- Murphy CL. A comparison of microplastics in farmed and wild shellfish near Vancouver Island and potential implications for contaminant transfer to humans. *Royal Roads University (Canada)*, 2018.
- Murphy J. *Additives for plastics handbook*: Elsevier, 2001.
- Murray F, Cowie PR. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin* 2011; 62: 1207-1217.
- Naik RK, Naik MM, D'Costa PM, Shaikh F. Microplastics in ballast water as an emerging source and vector for harmful chemicals, antibiotics, metals, bacterial pathogens and HAB species: A potential risk to the marine environment and human health. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 149: 110525.
- Nait-Ali KL. *Le PET recyclé en emballages alimentaires: approche expérimentale et modélisation*. Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, 2008.
- Nakata H, Murata S, Filatreau J. Occurrence and concentrations of benzotriazole UV stabilizers in marine organisms and sediments from the Ariake Sea, Japan. *Environmental science & technology* 2009; 43: 6920-6926.

- Nakata H, Shinohara R-I, Nakazawa Y, Isobe T, Sudaryanto A, Subramanian A, et al. Asia-Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64: 2211-2218.
- Napper IE, Thompson RC. Plastic debris in the marine environment: history and future challenges. *Global Challenges* 2020; 4: 1900081.
- Ncube LK, Ude AU, Ogunmuyiwa EN, Zulkifli R, Beas IN. Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid based materials. *Materials* 2020; 13: 4994.
- Neale PA, Antony A, Bartkow ME, Farré MJ, Heitz A, Kristiana I, et al. Bioanalytical Assessment of the Formation of Disinfection Byproducts in a Drinking Water Treatment Plant. *Environmental Science & Technology* 2012; 46: 10317-10325.
- Nelms SE, Duncan EM, Patel S, Badola R, Bhola S, Chakma S, et al. Riverine plastic pollution from fisheries: Insights from the Ganges River system. *Science of The Total Environment* 2021; 756: 143305.
- Nerin C, Alfaro P, Aznar M, Domeño C. The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review. *Analytica Chimica Acta* 2013; 775: 14-24.
- Net S, Delmont A, Sempéré R, Paluselli A, Ouddane B. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Science of The Total Environment* 2015; 515-516: 162-180.
- Nice HE, Morrith D, Crane M, Thorndyke M. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Marine Ecology Progress Series* 2003; 256: 293-300.
- Nice HE, Thorndyke MC, Morrith D, Steele S, Crane M. Development of *Crassostrea gigas* Larvae is Affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin* 2000; 40: 491-496.
- NOAA Marine Debris Program. Report on Microfiber Pollution. 2022. <https://marinedebris.noaa.gov/interagency-marine-debris-coordinating-committee-reports/report-microfiber-pollution>
- Nobre CR, Santana MFM, Maluf A, Cortez FS, Cesar A, Pereira CDS, et al. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin* 2015; 92: 99-104.
- O'Connor IA, Golsteijn L, Hendriks AJ. Review of the partitioning of chemicals into different plastics: consequences for the risk assessment of marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 113: 17-24.
- OCDE. (Organisation de coopération et de développement économiques) Emission Scenario Document on Plastic Additives. Series on Emission Scenario Documents 2004; No 3.
- Odermatt J, Meier D, Leicht K, Meyer R, Runge T. Approaches to applying internal standards for the quantification of paper additives by Py-GC/MSD. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2003; 68-69: 269-285.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009; 364: 2047-2062.
- Okeke ES, Huang B, Mao G, Chen Y, Zhengjia Z, Qian X, et al. Review of the environmental occurrence, analytical techniques, degradation and toxicity of TBBPA and its derivatives. *Environmental Research* 2022; 206: 112594.
- Okoffo ED, Ribeiro F, O'Brien JW, O'Brien S, Tschärke BJ, Gallen M, et al. Identification and quantification of selected plastics in biosolids by pressurized liquid extraction combined with double-shot pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. *Science of The Total Environment* 2020; 715: 136924.
- Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, Guilhermino L. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological indicators* 2013; 34: 641-647.

- Oliviero M, Tato T, Schiavo S, Fernandez V, Manzo S, Beiras R. Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Pollut* 2019; 247: 706-715.
- Oltmanns J, Licht O, Bohlen M-L, Schwarz M, Escher S, Silano V, et al. Potential emerging chemical risks in the food chain associated with substances registered under REACH. *Environmental Science: Processes & Impacts* 2020; 22: 105-120.
- Ory NC, Sobral P, Ferreira JL, Thiel M. Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Science of The Total Environment* 2017; 586: 430-437.
- OSPAR.Beach Litter Monitoring.Consulté le: 21/07/2022,<https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/committee-assessments/eiha-thematic-assessments/marine-litter/beach-litter-monitoring/>.
- OSPAR C, Wenneker B, Oosterbaan L. Guideline for Monitoring Marine Litter on the Beaches in the OSPAR Maritime Area. Edition 1.0. 2010.
- Oßmann BE, Sarau G, Holtmannspötter H, Pischetsrieder M, Christiansen SH, Dicke W. Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research* 2018; 141: 307-316.
- Özlem ÇA, Hatice P. Effects of bisphenol A on the embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Environmental Toxicology: An International Journal* 2008; 23: 387-392.
- Pagev. World & Turkish plastics industry report. 2016.
- Palace VP, Pleskach K, Halldorson T, Danell R, Wautier K, Evans B, et al. Biotransformation enzymes and thyroid axis disruption in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane diastereoisomers. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 1967-72.
- Paluselli A, Fauvelle V, Galgani F, Sempere R. Phthalate Release from Plastic Fragments and Degradation in Seawater. *Environ Sci Technol* 2019; 53: 166-175.
- Pannetier P, Cachot J, Clérandeau C, Faure F, Van Arkel K, de Alencastro LF, et al. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on beaches: Part I-adverse effects on fish cell line. *Environmental Pollution* 2019; 248: 1088-1097.
- Parlement Européen. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. *Journal officiel de l'Union Européenne*. 2001. Available on: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32000L0060&from=FR>.
- Paseiro-Cerrato R, MacMahon S, Ridge CD, Noonan GO, Begley TH. Identification of unknown compounds from polyester cans coatings that may potentially migrate into food or food simulants. *Journal of Chromatography A* 2016; 1444: 106-113.
- Paul-Pont I, Tallec K, Gonzalez-Fernandez C, Lambert C, Vincent D, Mazurais D, et al. Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Frontiers in Marine Science* 2018; 5: 252.
- Pedà C, Caccamo L, Fossi MC, Gai F, Andaloro F, Genovese L, et al. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution* 2016; 212: 251-256.
- Peng J-H, Huang C-W, Weng Y-M, Yak H-K. Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish samples from rivers and estuaries in Taiwan. *Chemosphere* 2007; 66: 1990-1997.
- Perlstein P, Orme P. Determination of polymeric hindered-amine light stabilisers in plastics by pyrolysis—gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1985; 325: 87-93.
- Peters CA, Thomas PA, Rieper KB, Bratton SP. Foraging preferences influence microplastic ingestion by six marine fish species from the Texas Gulf Coast. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 124: 82-88.
- Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* 2015; 6: 205-222.

- Pham CK, Ramirez-Llodra E, Alt CH, Amaro T, Bergmann M, Canals M, et al. Marine litter distribution and density in European seas, from the shelves to deep basins. *PLoS One* 2014; 9: e95839.
- Phillips MB, Bonner TH. Occurrence and amount of microplastic ingested by fishes in watersheds of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 2015; 100: 264-269.
- Phuong NN, Poirier L, Pham QT, Lagarde F, Zalouk-Vergnoux A. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? *Marine Pollution Bulletin* 2018; 129: 664-674.
- Pijnenburg A, Everts J, Boer Jd, Boon J. Polybrominated biphenyl and diphenylether flame retardants: analysis, toxicity, and environmental occurrence. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 1995: 1-26.
- Plastic Europe. The facts 2019. 2019. <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2019-Plastics-the-facts.pdf>
- PlasticEurope. The facts 2020 2020. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>
- PlasticEurope. The facts 2021. 2021. <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>
- Pohlert T. Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums. 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/PMCMR/PMCMR.pdf>
- Pop A, Drugan T, Gutleb AC, Lupu D, Cherfan J, Loghin F, et al. Estrogenic and anti-estrogenic activity of butylparaben, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate and their binary mixtures on two estrogen responsive cell lines (T47D-Kbluc, MCF-7). *Journal of Applied Toxicology* 2018; 38: 944-957.
- Potocka M, Bayer RC, Potocki M. Plastic pollution affects American lobsters, *Homarus americanus*. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 138: 545-548.
- Pritchard G. *Plastics additives: an AZ reference*. Vol 1: Springer Science & Business Media, 2012.
- Prust M, Meijer J, Westerink RHS. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Part Fibre Toxicol* 2020; 17: 24.
- Qian S, Ji H, Wu X, Li N, Yang Y, Bu J, et al. Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products. *PLoS One* 2018; 13: e0208467.
- Quénéa K, Derenne S, González-Vila FJ, González-Pérez JA, Mariotti A, Largeau C. Double-shot pyrolysis of the non-hydrolysable organic fraction isolated from a sandy forest soil (Landes de Gascogne, South-West France). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2006; 76: 271-279.
- R Core Team. R: The R Project for Statistical Computing, Consulté le: 2022-05-15, <https://www.r-project.org/>,
- Ragaert K, Delva L, Van Geem K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste management* 2017; 69: 24-58.
- Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, Catalano P, Notarstefano V, Carnevali O, et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International* 2021; 146: 106274.
- Rajamani U, Gross AR, Ocampo C, Andres AM, Gottlieb RA, Sareen D. RETRACTED ARTICLE: Endocrine disruptors induce perturbations in endoplasmic reticulum and mitochondria of human pluripotent stem cell derivatives. *Nature Communications* 2017; 8: 219.
- Ramu K, Kajiwara N, Isobe T, Takahashi S, Kim E-Y, Min B-Y, et al. Spatial distribution and accumulation of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in blue mussels (*Mytilus edulis*) from coastal waters of Korea. *Environmental Pollution* 2007; 148: 562-569.
- Randle D, Freeman R, Hosaka A, Watanabe C. A fast, easy and “green” thermal desorption-GC/MS method for the analysis of phthalate esters in PVC. *Gulf Coast Conference* October 16, 2013, Gulf Coast, 2013.
- Rani M, Shim WJ, Han GM, Jang M, Al-Odaini NA, Song YK, et al. Qualitative analysis of additives in plastic marine debris and its new products. *Archives of environmental contamination and toxicology* 2015; 69: 352-366.

- Rani M, Shim WJ, Han GM, Jang M, Song YK, Hong SH. Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. *Science of The Total Environment* 2017; 579: 745-754.
- Ranjan VP, Joseph A, Goel S. Microplastics and other harmful substances released from disposable paper cups into hot water. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 404: 124118.
- Raychoudhury SS, Blake CA, Millette CF. Toxic Effects of Octylphenol on Cultured Rat Spermatogenic Cells and Sertoli Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999; 157: 192-202.
- Renzi Monia, Grazioli Eleonora, Bertacchini Eleonora, Andrea B. Microparticles in Table Salt: Levels and Chemical Composition of the Smallest Dimensional Fraction. *Journal of Marine Science and Engineering*. 7, 2019.
- Restek.EPA Method 8140/8141/8141A Organophosphorus Pesticides on Rtx®-35, Consulté le: 11/08/2022, [https://ez.restek.com/images/cgram/gc\\_ev00412.pdf](https://ez.restek.com/images/cgram/gc_ev00412.pdf).
- Restek.Semivolatiles on Rxi-5Sil MS by U.S. EPA Method 8270 Using the GC Accelerator Kit and Split Injection with a 120 V GC Oven, Consulté le: 11/08/2022, [https://ez.restek.com/images/cgram/gc\\_ev1476.pdf](https://ez.restek.com/images/cgram/gc_ev1476.pdf).
- Rhim J-W, Hong S-I, Ha C-S. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT-Food Science and Technology* 2009; 42: 612-617.
- Rial-Otero R, Galesio M, Capelo J-L, Simal-Gándara J. A Review of Synthetic Polymer Characterization by Pyrolysis-GC-MS. *Chromatographia* 2009; 70: 339-348.
- Rice MR, Gold HS. Polypropylene as an adsorbent for trace organics in water. *Analytical Chemistry* 1984; 56: 1436-1440.
- Riess M, Thoma H, Vierle O, van Eldik R. Identification of flame retardants in polymers using curie point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2000: 14.
- Rios Mendoza LM, Taniguchi S, Karapanagioti HK. Advanced Analytical Techniques for Assessing the Chemical Compounds Related to Microplastics. *Comprehensive Analytical Chemistry Characterization and Analysis of Microplastics*. Elsevier, Amsterdam 2017; 75: 209-240.
- Roberson MA, Patonay G. <Robertson., 1990 - antiUVs - pyr GCMS - non directe.pdf>. *Journal of Chromatography A* 1990; 505: 375-384.
- Rochman CM. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. Springer, Cham, 2015, pp. 117-140.
- Rochman CM, Brookson C, Bikker J, Djuric N, Earn A, Bucci K, et al. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environ Toxicol Chem* 2019; 38: 703-711.
- Rochman CM, Hoh E, Kurobe T, Teh SJ. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific reports* 2013; 3: 1-7.
- Rochman CM, Lewison RL, Eriksen M, Allen H, Cook A-M, Teh SJ. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish tissue may be an indicator of plastic contamination in marine habitats. *Science of the total environment* 2014; 476: 622-633.
- Rochman CM, Tahir A, Williams SL, Baxa DV, Lam R, Miller JT, et al. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific reports* 2015; 5: 1-10.
- Romera-Castillo C, Pinto M, Langer TM, Álvarez-Salgado XA, Herndl GJ. Dissolved organic carbon leaching from plastics stimulates microbial activity in the ocean. *Nature Communications* 2018; 9: 1430.
- Rummel CD, Escher BI, Sandblom O, Plassmann MM, Arp HPH, MacLeod M, et al. Effects of Leachates from UV-Weathered Microplastic in Cell-Based Bioassays. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 9214-9223.
- Rummel CD, Jahnke A, Gorokhova E, Kühnel D, Schmitt-Jansen M. Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology Letters* 2017; 4: 258-267.
- Rummel CD, Löder MGJ, Fricke NF, Lang T, Griebeler E-M, Janke M, et al. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 102: 134-141.

- Ryan PG, Moore CJ, Van Franeker JA, Moloney CL. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009; 364: 1999-2012.
- S. Göttermann, Bonten C, Kloeppe A, Kaiser S, Brümme F. Marine littering - effects and degradation. Conference paper "24. Stuttgarter Kunststoffkolloquium", 2015.
- Saad N, Bereketoglu C, Pradhan A. Di(isononyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) alters transcriptional profiles, lipid metabolism and behavior in zebrafish larvae. *Heliyon* 2021; 7: e07951.
- Santana M, Ascer L, Custódio M, Moreira F, Turra A. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 106: 183-189.
- Schiavo S, Oliviero M, Chiavarini S, Manzo S. Adverse effects of oxo-degradable plastic leachates in freshwater environment. *Environmental Science and Pollution Research* 2020; 27: 8586-8595.
- Schmid P, Welle F. Chemical Migration from Beverage Packaging Materials—A Review. *Beverages* 2020; 6.
- Schmidt C, Krauth T, Wagner S. Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environmental Science & Technology* 2017; 51: 12246-12253.
- Schrank I, Trotter B, Dummert J, Scholz-Böttcher B, Löder M-G, Laforsch C. Effects of microplastic particles and leaching additive on the life history and morphology of *Daphnia magna*. *Environmental pollution* 2019; 255: 113233.
- Schwabl P, Köppel S, Königshofer P, Bucsics T, Trauner M, Reiberger T, et al. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine* 2019; 171: 453-457.
- Sellström U, Kierkegaard A, de Wit C, Jansson B. Polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from a Swedish river. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 1998; 17: 1065-1072.
- Senthil Kumaran S, Kavitha C, Ramesh M, Grummt T. Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. *Journal of Applied Toxicology* 2011; 31: 752-761.
- Serra H, Beausoleil C, Habert R, Minier C, Picard-Hagen N, Michel C. Evidence for bisphenol B endocrine properties: scientific and regulatory perspectives. *Environmental health perspectives* 2019; 127: 106001.
- Servos MR. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal* 1999; 34: 123-178.
- Seuront L. Microplastic leachates impair behavioural vigilance and predator avoidance in a temperate intertidal gastropod. *Biol Lett* 2018; 14.
- Sharma S, Chatterjee S. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research* 2017; 24: 21530-21547.
- Sheikh IA, Beg MA. Structural characterization of potential endocrine disrupting activity of alternate plasticizers di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA), acetyl tributyl citrate (ATBC) and 2,2,4-trimethyl 1,3-pentanediol diisobutyrate (TPIB) with human sex hormone-binding globulin. *Reprod Toxicol* 2019; 83: 46-53.
- Shelley LK, Ross PS, Miller KM, Kaukinen KH, Kennedy CJ. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on general health, disease susceptibility and gene expression. *Aquatic toxicology* 2012; 124: 217-226.
- Silva MJ, Jia T, Samandar E, Preau JL, Calafat AM. Environmental exposure to the plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH) in US adults (2000—2012). *Environmental Research* 2013; 126: 159-163.
- Silva MM, Maldonado GC, Castro RO, de Sá Felizardo J, Cardoso RP, Anjos RMD, et al. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 141: 561-568.
- Singh B, Sharma N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer degradation and stability* 2008; 93: 561-584.



- Sitholé B, Pimentel EJ. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in pulp samples by Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2009; 85: 465-469.
- Sjollem SB, Redondo-Hasselerharm P, Leslie HA, Kraak MHS, Vethaak AD. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic Toxicology* 2016; 170: 259-261.
- Smith M, Love DC, Rochman CM, Neff RA. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports* 2018; 5: 375-386.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester J. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment international* 2008; 34: 1033-1049.
- Sobeih KL, Baron M, Gonzalez-Rodriguez J. Recent trends and developments in pyrolysis-gas chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1186: 51-66.
- Solé M, López de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology* 2000; 34: 5076-5083.
- Solis M, Silveira S. Technologies for chemical recycling of household plastics – A technical review and TRL assessment. *Waste Management* 2020; 105: 128-138.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental health perspectives* 1991; 92: 167-173.
- Staples C. *Phthalate esters*: Springer Science & Business Media, 2003.
- Staples C, Mihaich E, Carbone J, Woodburn K, Klecka G. A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Human and Ecological Risk Assessment* 2004; 10: 999-1017.
- Steele S, Mulcahy MF. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1999; 79: 673-686.
- Subramanian MN. *Plastics additives and testing*: John Wiley & Sons, 2013.
- Suhrhoff TJ, Scholz-Böttcher BM. Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics — A lab experiment. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 102: 84-94.
- Sun B, Hu Y, Cheng H, Tao S. Releases of brominated flame retardants (BFRs) from microplastics in aqueous medium: Kinetics and molecular-size dependence of diffusion. *Water Research* 2019; 151: 215-225.
- Sun B, Liu J, Zhang Y-Q, Leungb KM, Zeng EY. Leaching of polybrominated diphenyl ethers from microplastics in fish oil: kinetics and bioaccumulation. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 406: 124726.
- Sun P, Liu X, Zhang M, Li Z, Cao C, Shi H, et al. Sorption and leaching behaviors between aged MPs and BPA in water: The role of BPA binding modes within plastic matrix. *Water Research* 2021; 195: 116956.
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet MEJ, et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the national academy of sciences* 2016; 113: 2430-2435.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental health perspectives* 2005; 113: 1056-1061.
- Szczepanska N, Kudlak B, Tsakovski S, Yotova G, Nedyalkova M, Simeonov V, et al. Modeling and MANOVA studies on toxicity and endocrine potential of packaging materials exposed to different extraction schemes. *Environ Res* 2018; 165: 294-305.
- Takada H. Call for pellets! International Pellet Watch global monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. *Marine Pollution Bulletin* 2006; 52: 1547-1548.
- Taltec K, Gabriele M, Paul-Pont I, Alunno-Bruscia M, Huvet A. Tire rubber chemicals reduce juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) filtration and respiration under experimental conditions. *Marine Pollution Bulletin* 2022; 181: 113936.

- Taltec K, Huvet A, Di Poi C, Gonzalez-Fernandez C, Lambert C, Petton B, et al. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ Pollut* 2018; 242: 1226-1235.
- Taltec K, Huvet A, Yeuc'h V, Le Goic N, Paul-Pont I. Chemical effects of different types of rubber-based products on early life stages of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Hazard Mater* 2022; 427: 127883.
- Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, Vom Saal FS. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009; 364: 2079-2096.
- Tanaka K, Takada H, Yamashita R, Mizukawa K, Fukuwaka M-a, Watanuki Y. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Marine pollution bulletin* 2013; 69: 219-222.
- Tanaka K, Takada H, Yamashita R, Mizukawa K, Fukuwaka M-a, Watanuki Y. Facilitated leaching of additive-derived PBDEs from plastic by seabirds' stomach oil and accumulation in tissues. *Environmental science & technology* 2015; 49: 11799-11807.
- Tanaka Y, Takahashi K, Sasao T, Kirigaya T, Hosoi S, Nagaoka N, et al. [Detection of tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite (Irgafos 168, antioxidant in plastics) and its oxide in commercial frozen vegetables]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2003; 44: 181-5.
- Taneepanichskul N, Purkiss D, Miodownik M. A Review of Sorting and Separating Technologies Suitable for Compostable and Biodegradable Plastic Packaging. *Frontiers in Sustainability* 2022; 3.
- Tato T, Salgueiro-González N, León VM, González S, Beiras R. Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Acartia clausi*). *Environmental Pollution* 2018; 232: 173-182.
- Taylor M, Gwinnett C, Robinson LF, Woodall LC. Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms. *Scientific reports* 2016; 6: 1-9.
- Ter Halle A, Jeanneau L, Martignac M, Jarde E, Pedrono B, Brach L, et al. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ Sci Technol* 2017; 51: 13689-13697.
- Ter Halle A, Ladirat L, Gendre X, Goudouneche D, Pusineri C, Routaboul C, et al. Understanding the fragmentation pattern of marine plastic debris. *Environmental science & technology* 2016; 50: 5668-5675.
- Terán A, Gonzalez-Vila FJ, Gonzalez-Perez JA. Detection of organic contamination in sediments by double-shoot pyrolysis-GC/MS. *Environmental Chemistry Letters* 2009; 7: 301-308.
- Tetu SG, Sarker I, Schrameyer V, Pickford R, Elbourne LDH, Moore LR, et al. Plastic leachates impair growth and oxygen production in *Prochlorococcus*, the ocean's most abundant photosynthetic bacteria. *Commun Biol* 2019; 2: 184.
- Teuten EL, Rowland SJ, Galloway TS, Thompson RC. Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. *Environmental Science & Technology* 2007; 41: 7759-7764.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DR, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* 2009; 364: 2027-2045.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DR, Barlaz MA, Jonsson S, Bjorn A, et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364: 2027-45.
- Thiam M, Fall M. Engineering properties of a building material with melted plastic waste as the only binder. *Journal of Building Engineering* 2021; 44: 102684.
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AW, et al. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 2004; 304: 838-838.
- Thornton Hampton LM, Lowman H, Coffin S, Darin E, De Frond H, Hermabessiere L, et al. A living tool for the continued exploration of microplastic toxicity. *Microplastics and Nanoplastics* 2022; 2: 13.
- Tian Z, Zhao H, Peter KT, Gonzalez M, Wetzel J, Wu C, et al. A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon. *Science* 2021; 371: 185-189.

- Trimpin S, Wijerathne K, McEwen CN. Rapid methods of polymer and polymer additives identification: multi-sample solvent-free MALDI, pyrolysis at atmospheric pressure, and atmospheric solids analysis probe mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2009; 654: 20-5.
- Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere* 2000; 41: 757-762.
- Tsuge S, Ohtani H, Watanabe C. *Pyrolysis-GC/MS data book of synthetic polymers: pyrograms, thermograms and MS of pyrolyzates*: Elsevier, 2011.
- Uguen M, Nicastro KR, Zardi GI, Gaudron SM, Spilmont N, Akoueson F, et al. Microplastic leachates disrupt the chemotactic and chemokinetic behaviours of an ecosystem engineer (*Mytilus edulis*). *Chemosphere* 2022; 306: 135425.
- UNEP. Overview Report I: Worldwide initiatives to identify endocrine disrupting 1149 chemicals (EDCs) and potential EDCs. International Panel on Chemical Pollution (IPCP). 2018.
- UNEP. Drowning in Plastics – Marine Litter and Plastic Waste Vital Graphics. 2021. <https://wedocs.unep.org/xmlui/bitstream/handle/20.500.11822/36964/VITGRAPH.pdf>
- UNEP, Kershaw P. Marine plastic debris and microplastics–Global lessons and research to inspire action and guide policy change: United Nations Environment Programme, 2016.
- Uribe-Echeverría T, Beiras R. Acute toxicity of bioplastic leachates to *Paracentrotus lividus* sea urchin larvae. *Marine Environmental Research* 2022; 176: 105605.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency: Chemical Data Reporting (CDR) Rule. 2012.
- Vagner M, Boudry G, Courcot L, Vincent D, Dehaut A, Duflos G, et al. Experimental evidence that polystyrene nanoplastics cross the intestinal barrier of European seabass. *Environment International* 2022; 166: 107340.
- Van Cauwenberghe L, Claessens M, Vandegehuchte MB, Janssen CR. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental pollution* 2015; 199: 10-17.
- Van Cauwenberghe L, Janssen CR. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution* 2014; 193: 65-70.
- van de Poel I, Robaey Z. Safe-by-Design: from Safety to Responsibility. *NanoEthics* 2017; 11: 297-306.
- Van de Ven TG. Kinetic aspects of polymer and polyelectrolyte adsorption on surfaces. *Advances in colloid and interface science* 1994; 48: 121-140.
- van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere* 2012; 88: 1119-53.
- Van der Ven LT, Van de Kuil T, Verhoef A, Verwer CM, Lilienthal H, Leonards PE, et al. Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology* 2008; 245: 76-89.
- van Raamsdonk LW, van der Zande M, Koelmans AA, Hoogenboom RL, Peters RJ, Groot MJ, et al. Current insights into monitoring, bioaccumulation, and potential health effects of microplastics present in the food chain. *Foods* 2020; 9: 72.
- Vandermeersch G, Lourenço HM, Alvarez-Muñoz D, Cunha S, Diogène J, Cano-Sancho G, et al. Environmental contaminants of emerging concern in seafood – European database on contaminant levels. *Environmental Research* 2015; 143: 29-45.
- Vendel AL, Bessa F, Alves VEN, Amorim ALA, Patrício J, Palma ART. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 117: 448-455.
- Venema A, Boom-Van Geest RC. In-situ hydrolysis/methylation pyrolysis CGC for the characterization of polyaramides. *Journal of Microcolumn Separations* 1995; 7: 337-343.

- Ventrice P, Ventrice D, Russo E, De Sarro G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013; 36: 88-96.
- Vera P, Canellas E, Nerín C. Identification of non volatile migrant compounds and NIAS in polypropylene films used as food packaging characterized by UPLC-MS/QTOF. *Talanta* 2018; 188: 750-762.
- Verslycke TA, Vethaak AD, Arijs K, Janssen CR. Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Environmental Pollution* 2005; 136: 19-31.
- von Eyken A, Ramachandran S, Bayen S. Suspected-target screening for the assessment of plastic-related chemicals in honey. *Food Control* 2020; 109: 106941.
- von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology* 2012; 46: 11327-11335.
- Wadhia K, Thompson KC. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26: 300-307.
- Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, Rubin BS, Sonnenschein C, Shioda T, et al. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PloS one* 2013; 8: e63902.
- Waite HR, Donnelly MJ, Walters LJ. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine Pollution Bulletin* 2018; 129: 179-185.
- Walker TW, Frelka N, Shen Z, Chew AK, Banick J, Grey S, et al. Recycling of multilayer plastic packaging materials by solvent-targeted recovery and precipitation. *Science Advances*; 6: eaba7599.
- Wang FC-Y. Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography- II. Flame retardants. *Journal of Chromatography A* 2000a; 886: 225-235.
- Wang FC-Y. Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography - IV. Antioxydants. *Journal of Chromatography A* 2000b; 891: 325-336.
- Wang FC-Y. Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography I. Plasticizers. *J. Chromatogr. A* 2000c: 12.
- Wang S, Hu M, Zheng J, Huang W, Shang Y, Kar-Hei Fang J, et al. Ingestion of nano/micro plastic particles by the mussel *Mytilus coruscus* is size dependent. *Chemosphere* 2021; 263: 127957.
- Wang Y, Zhou C, Xiao Y, Zhou S, Wang C, Chen X, et al. Preparation and evaluation of acetylated mixture of citrate ester plasticizers for poly (vinyl chloride). *Iranian Polymer Journal* 2018; 27: 423-432.
- Wang YL, Lee YH, Chiu IJ, Lin YF, Chiu HW. Potent Impact of Plastic Nanomaterials and Micromaterials on the Food Chain and Human Health. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
- Ward JE, Kach DJ. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 2009; 68: 137-142.
- Ward JE, Zhao S, Holohan BA, Mladinich KM, Griffin TW, Wozniak J, et al. Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environmental Science & Technology* 2019; 53: 8776-8784.
- Wardrop P, Shimeta J, Nugegoda D, Morrison PD, Miranda A, Tang M, et al. Chemical pollutants sorbed to ingested microbeads from personal care products accumulate in fish. *Environmental science & technology* 2016; 50: 4037-4044.
- Wato E, Asahiyama M, Suzuki A, Funyu S, Amano Y. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity <br>9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 2009; 34: SP101-SP109.

- Watts AJR, Urbina MA, Corr S, Lewis C, Galloway TS. Ingestion of Plastic Microfibers by the Crab *Carcinus maenas* and Its Effect on Food Consumption and Energy Balance. *Environmental Science & Technology* 2015; 49: 14597-14604.
- Wegner A, Besseling E, Foekema EM, Kamermans P, Koelmans AA. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis L.*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012; 31: 2490-2497.
- Weiss L, Ludwig W, Heussner S, Canals M, Ghiglione J-F, Estournel C, et al. The missing ocean plastic sink: Gone with the rivers. *Science* 2021; 373: 107-111.
- Welden NA, Abylkhani B, Howarth LM. The effects of trophic transfer and environmental factors on microplastic uptake by plaice, *Pleuronectes platessa*, and spider crab, *Maja squinado*. *Environmental Pollution* 2018; 239: 351-358.
- Welden NAC, Cowie PR. Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environmental Pollution* 2016; 218: 895-900.
- WHO, Organization WH. Microplastics in Drinking-Water, Consulté le: 15/08/2022, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326499/9789241516198-eng.pdf?ua=1>.
- Wiesinger H, Wang Z, Hellweg S. Deep Dive into Plastic Monomers, Additives, and Processing Aids. *Environmental Science & Technology* 2021; 55: 9339-9351.
- Wright SL, Kelly FJ. Plastic and human health: a micro issue? *Environmental science & technology* 2017; 51: 6634-6647.
- Wright SL, Thompson RC, Galloway TS. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution* 2013; 178: 483-492.
- Wünsch JR. Polystyrene: Synthesis, production and applications. 2000.
- Xiang P, Liu R-Y, Li C, Gao P, Cui X-Y, Ma LQ. Effects of organophosphorus flame retardant TDCPP on normal human corneal epithelial cells: implications for human health. *Environmental Pollution* 2017; 230: 22-30.
- Xue B, Zhang L, Li R, Wang Y, Guo J, Yu K, et al. Underestimated microplastic pollution derived from fishery activities and "hidden" in deep sediment. *Environmental science & technology* 2020; 54: 2210-2217.
- Yadav A, Mangaraj S, Singh R, Kumar N, Arora S. Biopolymers as packaging material in food and allied industry. 2018.
- Yan Y, Zhu F, Zhu C, Chen Z, Liu S, Wang C, et al. Dibutyl phthalate release from polyvinyl chloride microplastics: Influence of plastic properties and environmental factors. *Water Research* 2021; 204: 117597.
- Yanagisawa H, Kudo Y, Nakagawa K, Miyagawa H, Maruyama F, Fujimaki S. Simultaneous Screening of Major Flame Retardants and Plasticizers in Polymer Materials Using Pyrolyzer/Thermal Desorption Gas Chromatography Mass Spectrometry (Py/TD-GC-MS). *Molecules* 2018; 23.
- Yanagisawa H, Maruyama F, Fujimaki S. Verification of simultaneous screening for major restricted additives in polymer materials using pyrolyzer/thermal desorption gas-chromatography mass spectrometry (Py/TD-GC-MS). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2019; 137: 37-42.
- Yang D, Shi H, Li L, Li J, Jabeen K, Kollandhasamy P. Microplastic pollution in table salts from China. *Environmental science & technology* 2015; 49: 13622-13627.
- Yang L, Zhang Y, Kang S, Wang Z, Wu C. Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *Science of The Total Environment* 2021; 780: 146546.
- Ye X, Wang P, Wu Y, Zhou Y, Sheng Y, Lao K. Microplastic acts as a vector for contaminants: the release behavior of dibutyl phthalate from polyvinyl chloride pipe fragments in water phase. *Environmental Science and Pollution Research* 2020; 27: 42082-42091.
- Ye X, Zhou X, Hennings R, Kramer J, Calafat AM. Potential external contamination with bisphenol A and other ubiquitous organic environmental chemicals during biomonitoring analysis: an elusive laboratory challenge. *Environ Health Perspect* 2013; 121: 283-6.

- Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T, et al. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 2001; 20: 2552-2560.
- Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science* 2016; 351: 1196-1199.
- Yu Y, Yu Z, Chen H, Han Y, Xiang M, Chen X, et al. Tetrabromobisphenol A: Disposition, kinetics and toxicity in animals and humans. *Environ Pollut* 2019; 253: 909-917.
- Yuan J, Ma J, Sun Y, Zhou T, Zhao Y, Yu F. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of The Total Environment* 2020; 715: 136968.
- Yuzawa T, Hosaka A, Watanabe C, Tsuge S. Evaluation of the Thermal Desorption-GC/MS Method for the Determination of Decabromodiphenyl Ether (DeBDE) in Order of a Few Hundred ppm Contained in a Certified Standard Polystyrene Sample. *Analytical Sciences* 2008; 24: 953-955.
- Yuzawa T, Watanabe C, Freeman RR, Tsuge S. Rapid determination of phthalates in plastic toys by a thermal desorption-GC/MS method. *Anal Sci* 2009; 25: 1057-8.
- Zero Waste France. BIOPLASTIQUES, COMPOSTABLES, BIOSOURCÉS : ON FAIT LE POINT !, Consulté le: 01/10/2022, <https://www.zerowasteFrance.org/bioplastiques-compostables-biosources/>,
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environmental science & technology* 2013; 47: 7137-7146.
- Zhang J. Phthalates Analysis With Method GB 5009.271-2016 Using the Agilent 8890 GC and MSD with Agilent JetClean. 2019. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-phthalates-8890-gc-jetclean-5994-0656en-agilent.pdf>
- Zhang Q, Song J, Li X, Peng Q, Yuan H, Li N, et al. Concentrations and distribution of phthalate esters in the seamount area of the Tropical Western Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 140: 107-115.
- Zhang Q, Xu EG, Li J, Chen Q, Ma L, Zeng EY, et al. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environmental Science & Technology* 2020; 54: 3740-3751.
- Zhang W, Chen L, An S, Liu K, Lin K, Zhao L. Toxic effects of the joint exposure of decabromodiphenyl ether (BDE209) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) on soil microorganism and enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014; 38: 586-594.
- Zhang W, Zhang S, Wang J, Wang Y, Mu J, Wang P, et al. Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environmental Pollution* 2017; 231: 541-548.
- Zhang Z, Ren N, Li Y-F, Kunisue T, Gao D, Kannan K. Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environmental science & technology* 2011; 45: 3909-3916.
- Zhao S, Ward JE, Danley M, Mincer TJ. Field-Based Evidence for Microplastic in Marine Aggregates and Mussels: Implications for Trophic Transfer. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 11038-11048.
- Zhou C, Beyerlein IJ, LeSar R. Plastic deformation mechanisms of fcc single crystals at small scales. *Acta Materialia* 2011; 59: 7673-7682.
- Zhou H, Yin N, Faiola F. Tetrabromobisphenol A (TBBPA): a controversial environmental pollutant. *Journal of Environmental Sciences* 2020; 97: 54-66.
- Zhou P, Huang C, Fang H, Cai W, Li D, Li X, et al. The abundance, composition and sources of marine debris in coastal seawaters or beaches around the northern South China Sea (China). *Marine pollution bulletin* 2011; 62: 1998-2007.
- Zimmermann L, Bartosova Z, Braun K, Oehlmann Jr, Völker C, Wagner M. Plastic products leach chemicals that induce in vitro toxicity under realistic use conditions. *Environmental science & technology* 2021; 55: 11814-11823.
- Zimmermann L, Dierkes G, Ternes TA, Völker C, Wagner M. Benchmarking the in vitro toxicity and chemical composition of plastic consumer products. *Environmental science & technology* 2019; 53: 11467-11477.

- Zimmermann L, Dombrowski A, Völker C, Wagner M. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environment international* 2020a; 145: 106066.
- Zimmermann L, Göttlich S, Oehlmann J, Wagner M, Völker C. What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental pollution* 2020b; 267: 115392.

# ANNEXES



## **Annexes**

### **Annexe 1**

La base de données développée est hébergée sous licence « Creative Common attribution 4.0 international » sur le site de Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6599058>) dans le but de la rendre accessible à tous.

Cette base de données a été créée à l'aide du logiciel Trace Finder™ (version 5.0.889.0) grâce à son outil de déconvolution permettant de déterminer précisément les ions caractéristiques des molécules d'intérêts et d'éliminer les potentiels ions provenant d'interférences ou contaminations. Par la suite, les ions (quantitatifs et qualitatif), spécifiques à chaque additif ont été déterminés à l'aide des informations disponibles dans la littérature et *via* les spectres de masses obtenus par notre méthode. Les indices de rétentions de Kovats ont ensuite été calculés. Pour finir, les spectres correspondant aux additifs d'intérêt accompagnés de leurs ions caractéristiques et de leurs indices de rétentions ont été inclus dans la base de données.

## Annexe 2

### Microplastic leachates disrupt the chemotactic and chemokinetic behaviours of an ecosystem engineer (*Mytilus edulis*).

Marine Uguen <sup>a,\*</sup>, Katy R. Nicastro <sup>a,b,c</sup>, Gerardo I. Zardi <sup>b</sup>, Sylvie M. Gaudron <sup>a,d</sup>, Nicolas Spilmont <sup>a</sup>, Fleurine Akoueson <sup>e,f</sup>, Guillaume Duflos <sup>e</sup>, Laurent Seuront <sup>a,b,e,g</sup>

<sup>a</sup> Univ. Lille, CNRS, Univ. Littoral Cote d'Opale, IRD, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Station Marine de Wimereux, F-59000, Lille, France

<sup>b</sup> Department of Zoology and Entomology, Rhodes University, Grahamstown, 6140, South Africa

<sup>c</sup> CCMAR–Centro de Ciencias do Mar, CIMAR Laboratório Associado, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, Faro, 8005-139, Portugal

<sup>d</sup> Sorbonne Université, UFR 927, F-75005, Paris, France

<sup>e</sup> ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, F-62200, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>f</sup> Univ. Littoral Cote d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, EA 7394, Institut Charles Violette, USC ANSES, INRAe, Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Picardie Jules Verne, Uni. Liège, F-62200, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>g</sup> Department of Marine Resources and Energy, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477, Japan

Corresponding author : [marine.uguen@univ-lille.fr](mailto:marine.uguen@univ-lille.fr)

#### Abstract

The massive contamination of the environment by plastics is an increasing global scientific and societal concern. Knowing whether and how these pollutants affect the behaviour of keystone species is essential to identify environmental risks effectively. Here, we focus on the effect of plastic leachates on the behavioural response of the common blue mussel *Mytilus edulis*, an ecosystem engineer responsible for the creation of biogenic structures that modify the environment and provide numerous ecosystem functions and services. Specifically, we assess the effect of virgin polypropylene beads on mussels' chemotactic (*i.e.* a directional movement in response to a chemical stimulus) and chemokinetic (*i.e.* a non-directional change in movement properties such as speed, distance travelled or turning frequency in response to a chemical stimulus) responses to different chemical cues (*i.e.* conspecifics, injured conspecifics and a predator, the crab *Hemigrapsus sanguineus*). In the presence of predator cues, individual mussels reduced both their gross distance and speed, changes interpreted here as an avoidance behaviour. When exposed to polypropylene leachates, mussels moved less compared to control conditions, regardless of the cues tested. Additionally, in presence of crab cues with plastic leachates, mussels significantly changed the direction of movement suggesting a leachate-induced loss of their negative chemotaxis response. Taken together, our results indicate that the behavioural response of *M. edulis* is cue-specific and that its anti-predator behaviour as well as its mobility are impaired when exposed to microplastic leachates, potentially affecting the functioning of the ecosystem that the species supports.

#### Keywords

Chemical stimulus, Chemodetection Predators, Blue mussel cues, Plastics, intertidal species

#### 10. Introduction

Chemical communication is a key process in ecology that has been extensively studied over a wide range of organisms, both terrestrial and marine (Zimmer and Butman, 2000; McClintock and Baker, 2001; Dicke and Takken, 2006; Paul et al., 2006; Ng et al., 2013; Tabata, 2018). Specifically, chemical signals play a key role in intra- and inter-specific interactions (*e.g.* predation, reproduction, competition, aggregation) and others processes such as habitat selection, eventually affecting individual fitness, and

community and ecosystems dynamics at larger scales (Murlis et al., 1992; Bradbury and Vehrencamp, 1998; Dicke and Takken, 2006; Bornancin et al., 2017; Zimmer and Butman, 2000). Many marine species rely on chemicals to get information about their environment (Zimmer and Butman, 2000). For instance, the majority of molluscs possess sensory organs, such as the osphradium that contains chemoreceptors which allows the detection of *e.g.* food, conspecifics and predators (Lucas, 1931; Morton, 1962; Lindberg and Sigwart, 2015).

Intertidal mussels are considered as key ecosystem engineers on both soft and hard substrates (Reise, 2002; Borthagaray and Carranza, 2007). Noticeably, these organisms are motile; they use their foot both to move and attach themselves to their substrate through the production of byssal threads, extracellular collagenous structure (Schneider et al., 2005; Waite et al., 2005). Both their motility and byssal production allow them to spatially self-organise into dense mono- and multi-layered beds, which decrease the vulnerability to predation, desiccation, heat, and wave dislodgement, while increasing fertilization success and survival (Nicastro et al., 2012; Iwasaki, 2015; Zardi et al., 2021). Through the formation of beds, intertidal mussels locally dominate rocky shores and operate a biogenic transformation of the habitat (Paine and Levin, 1981; Menge and Sutherland, 1987; Reise, 2002). These relatively stable and resilient structures enhance local biodiversity by facilitating the establishment and maintenance of a range of different species (Reise, 2002; Palomo et al., 2007; Borthagaray and Carranza, 2007; Arribas et al., 2014; Spilmont et al., 2018). Beyond their ecological role, mussels also play an important economic and heritage value through professional and recreational fishing, e.g. global aquaculture production for *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* was 287,957 tons in 2016 (FAO Fishstat) with an estimated net worth ranging between US\$2.5 10<sup>6</sup> and US\$100 10<sup>6</sup> in the United States only (Zippay and Helmuth, 2012).

Previous studies have shown that cues from damaged conspecifics and predators of intertidal mussels can significantly affect their movement and aggregation rate (Coté and Jelnikar, 1999; Nicastro et al., 2007; Kong et al., 2019), though exceptions exist (Commito et al., 2016; Kong et al., 2019; Manríquez et al., 2021). An exposure to these cues also triggers morphological and physiological changes such as thicker shell, production and quality of byssal threads (Leonard et al., 1999; Kong et al., 2019). Intertidal mussels can differentiate chemical signals from predators and behave accordingly to their specific prey handling techniques, e.g. the mussel *Mytilus edulis* increases byssus production when exposed to crab (*Cancer irroratus*) cue but not when exposed to starfish cue (*Asterias rubens*; Garner and Litvaitis, 2013). Though various mussel species share the sensory capacity to perceive, discriminate and adapt to different environmental chemical signals, the presence and intensity of behavioural responses to chemical stimuli, in particular in Mytilidae, is fundamentally cue-dependent (Nicastro et al., 2007; Garner and Litvaitis, 2013; Kong et al., 2019; Manríquez et al., 2021).

Chemotaxis (i.e. a directional change in movement in response to a chemical stimulus) and chemokinesis (i.e. a non-directional change in movement properties such as speed, distance

travelled or turning frequency in response to a chemical stimulus) are key behavioural processes involved in the response to chemical cues (Bell and Tobin, 1982; Wilkinson, 1985). Only a few studies have addressed chemotaxis in bivalves and interactions with conspecifics, i.e., De Vooys (2003) with *M. edulis* and Huang et al. (2007) with *Tridacna squamosa*, and between a bivalve (*Montacuta ferruginosa*) and its commensal species (*Echinocardium cordatum*; Morton, 1962). Specifically, the chemical communication on which an important part of behaviour is based, such as mate and food searching, as well as danger detection, can be altered by a range of anthropogenic chemicals (Fleeger et al., 2003; Lüring and Scheffer, 2007; Seuront, 2010, 2011, 2018). This disrupting effect of anthropogenic chemicals on intra and inter-species chemical communication has, to date, received considerably less attention.

This issue is, however, particularly relevant given the growing awareness of the ubiquity and toxicity of plastic compounds and their leachates in marine systems (Gall and Thompson, 2015; Jamieson et al., 2017; Gunaalan et al., 2020). Plastic pollution is one of the main challenges of the 21st century through their deleterious physical and chemical effects on aquatic life (Derraik, 2002; Gall and Thompson, 2015; Anderson et al., 2016; Rochman et al., 2016; Sussarellu et al., 2016; Auta et al., 2017), leading to the death of millions of aquatic organisms annually (Ocean Conference United Nations, 2017). These effects can be due to either macroplastic (>5 mm), microplastic (<5 mm) and nanoplastic (<100 nm) items either produced directly in the smaller form industrially or resulting from the breakdown of larger plastic items (Cole et al., 2011; Paul-Pont et al., 2018). Plastic pollution has also a far more pernicious effect on marine life through the release of various molecules that are either absorbed (i.e. intrinsically bounded) to the polymer during the manufacturing process (e.g. light and heat stabilizers, antioxidants, nucleating and antistatic agents, flame retardants, plasticizers and colorants) or adsorbed at the surface of a polymer such as persistent organic pollutants, which include polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, pesticides or heavy metals (Delaeter et al., 2022). Recent studies have shown that direct exposure to either microplastics (Crump et al., 2020) or microplastic leachates (Seuront, 2018) can interfere with the cognitive system, sensory perception, and thus behaviour of marine invertebrates. For instance, the intertidal mussel *M. edulis* behaviourally responds to microplastic leachates through an increase in aggregation rate and frequency (Seuront et al., 2021). However, despite the ever-increasing concern about the ecological impact of plastic leachates (Gunaalan et al., 2020; Delaeter et al., 2022), it is still unknown whether plastic leachates

interfere with conspecific or prey-predator chemical signals in bivalves in general, and in intertidal mussels in particular.

In this context, we aim to determine whether the chemotactic and chemokinetic responses in an ecologically and economically important intertidal mussel species are affected by microplastics leachates. To do so, we first assessed the presence of chemotactic and/or chemokinetic responses of *M. edulis* to cues from intact and injured conspecifics and the predatory cues from the invasive Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*. This species is invasive along European coast and has been reported in other regions, it was first recorded in France in 1999 (Breton et al., 2002) and became the dominant mussel predator of the rocky intertidal shores of the eastern English Channel (Rolet et al., 2020) less than two decades after its first report from our sampling area, *i.e.* 2006 (Dauvin et al., 2009). Noticeably, given their short common evolutionary history of *M. edulis* and *H. sanguineus*, our behavioural approach provides a first step towards the assessment of *M. edulis* naivety status (*i.e.* the ability to recognize a new predator as a threat). We subsequently inferred how leachates from virgin polypropylene pellets may alter *M. edulis* chemotactic and chemokinetic responses. We further discuss how the observed behavioural changes are relevant for the ecology of the species in the context of increasing anthropogenic pressure on marine coastal ecosystems.

## 11. Material and methods

### 11.1. Study organisms

Both individual *Mytilus edulis* (1.5–2.0 cm in shell length; Supplementary Materials, S1) and *H. sanguineus* (1.4–2.4 cm in length; Supplementary Materials, S1) were sampled in March 2021 at low tide on a rocky intertidal reef of the infra-littoral zone of the Fort de Croy (Wimereux, France; 50°45'52.3"N, 1°35'55.1"E) along the French coast of the English Channel.

Collected organisms were brought back to the laboratory within an hour. Prior to the experiments, mussels were acclimatised for 1 week under a natural 12:12 light:dark cycle in 85 L tanks filled with running aerated natural seawater (T = 10 °C, S = 33‰, pH = 8.08) directly pumped from the collection site, and no additional food was provided. *H. sanguineus* were sorted by sex, and kept in separate 85 L tanks in which crabs were acclimatised for 1 week and fed *ad libitum* daily with mussels previously crushed with a natural stone (to avoid the use of metal objects, hence to prevent metal ions from touching mussel tissue; Commito et al., 2016). Crabs were kept in darkness during the acclimation to enhance food consumption (Spilmont et al., 2015) and thus stimulate predator-induced alarm response in mussels as described here below.

### 11.2. Chemical cues

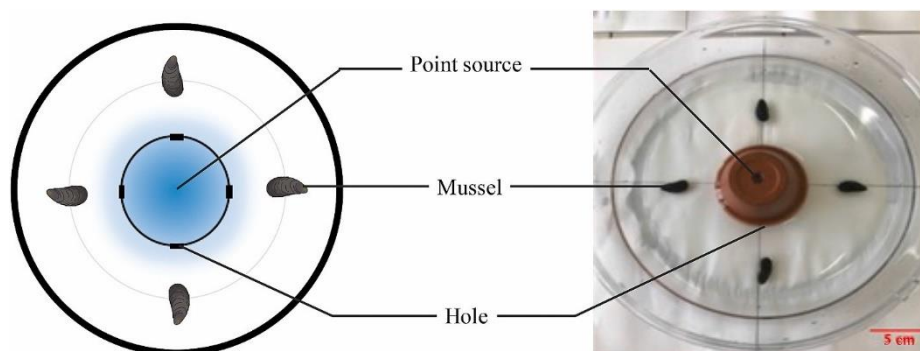
The effects of four natural chemical cues were assessed on the chemotactic and chemokinetic behaviour of *M. edulis*: (1) natural (*i.e.* control) seawater, (2) conspecific cues, (3) injured conspecific cues, and (4) fed crab cues. To assess the effect of microplastic leachates on the abovementioned natural cues, these treatments were subsequently mixed with microplastic (MP) leachate seawater. Note that the seawater used in all our experiments was consistently pumped directly from the collection site, hence could contain plastic leachates and cues naturally occurring at this site. As such, in the absence of additional experimentally-generated cues, natural seawater was considered as cue less.

Conspecific cue seawater was prepared through the addition of 20 mussels which were placed for a 24 h period into 1 L of aerated seawater. Injured conspecific cue seawater was prepared through the addition of 20 injured mussels previously crushed with a stone, to 1 L of aerated seawater for a 24 h period. Crab cue seawater was prepared through the addition of 3 males and 3 females *Hemigrapsus sanguineus* (sex ratio of 1: 1) into 1 L of aerated seawater for a 24 h period. For more information about exact sizes, see Supplementary Materials, S1.

For the mixed cues experiments, commercially available polypropylene pellets (typically 3.3–4.7 mm in diameter; Pemmiprodukt, Aachen, Germany) were added to the previous treatment (*i.e.* natural seawater, conspecific, injured conspecific and crab cues). They were left 24 h in aerated tanks at a concentration of 12 g of pellets per litre (*i.e.* 600 MPs per L, or equivalently 20 mL of MPs per L; Seuront., 2018; Seuront et al., 2021), in order to have four new solutions : seawater with leachates, conspecifics cues with leachates, injured conspecifics cues with leachates and crab cues with leachates. As a first approximation of the nature of the additive content of our polypropylene pellets, we ran a pyrolysis analysis coupled to a gas chromatography and a high-resolution spectrometer (see Supplementary Materials, S2), which led to the identification of 2 antioxidants (*i.e.* 4-tert-octylphenol, 4tOP, and Butyl hydroxytoluene, BHT) and 6 plasticizers (*i.e.* Diethyl phthalate, DEP, Diisobutyl phthalate, DIBP, Dibutyl phthalate, DBP, Bis (2-ethylhexyl)phthalate, DEHP, Di-n-octyl phthalate, DIOP, and Diisononyl phthalate, DINP).

### 11.3. Chemotactic and chemokinetic assay

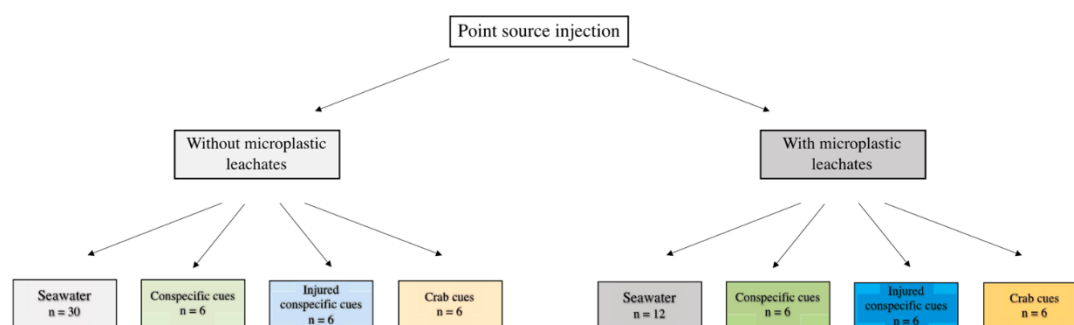
Both acclimation and experiments were consistently carried out under the same controlled



**Fig. 1.** Experimental design of one arena of the chemotaxis and chemokinesis experiments. Mussels were placed at equidistant distances from each other at 4 cm from the holes in a glass arena. To see how the liquid diffuses from the point source clay pot, see Supplementary Materials, S3.

**Table 1** Experimental timetable of the chemotaxis experiments. Stimuli without plastic leachates (light colour) : (grey) Control, natural seawater, i.e. no stimulus; (green) stimuli from conspecifics *Mytilus edulis*; (blue) stimuli from injured *M. edulis*; (red) stimuli from fed *Hemigrapsus sanguineus*; stimuli with microplastic (MP) leachates (dark colour). For each treatment, 6 replicates were performed each day (two replicates of the same treatment 3 times a day at 2 h interval) and an additional control (n = 6) was carried out on Day 5

Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Seawater	Seawater	Seawater	Seawater
Conspecific cues	Seawater + Microplastic Leachates	Seawater + Microplastic Leachates	Crab cues
Injured conspecifics cues	Conspecific cues + Microplastic Leachates	Injured conspecifics cues + Microplastic Leachates	Crab cues + Microplastic Leachates



**Fig. 2.** Flow diagram of the treatments and their replications. Stimuli without plastic leachates (light colour) : (grey) Control, natural seawater, i.e. no stimulus; (green) stimuli from conspecifics *Mytilus edulis*; (blue) stimuli from injured *M. edulis*; (orange) stimuli from fed *Hemigrapsus sanguineus*; stimuli with microplastic (MP) leachates (dark colour). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

conditions. Temperature was measured at the beginning and at the end of the experiment. Before the start of each experiment, byssal threads were carefully cut with scissors to separate the mussels from each other and from the substrate. Behavioural experiments were conducted in 22 cm diameter glass arenas with smooth, featureless surfaces (Fig. 1). To infer the presence of a chemotactic and/ or chemokinetic response of the individual mussel to the different cues, their positions were recorded with respect to a point source. This point source was obtained by four equidistant holes (0.5 cm in diameter) drilled through the side of a clay pot (6.5 cm in diameter; Fig. 1) which had a top central hole. Arenas were filled with 600 mL unfiltered seawater saturated in oxygen. Five milliliters (5 mL) of either control or treatment seawater was injected in a clay

pot through the top hole at a rate of  $0.7 \text{ mL s}^{-1}$ . Thus, the concentration of MP leachates, which is the same for all solutions containing plastic leachates, that flows out of the clay pot, was estimated at  $1.66 \text{ mL L}^{-1}$  (50 MPs per litre). Once fully mixed in the arena, this concentration reached  $0.166 \text{ mL L}^{-1}$  (5 MPs per litre), a concentration consistent with those found in coastal waters, i.e.  $3.5 \pm 2.0 \text{ MP L}^{-1}$  with concentrations between 1 and 6.4 MPs per wild *M. edulis* (United Kingdom; Li et al., 2018). Immediately after the treatment or control injection, each specimen was placed individually at a distance of 4 cm from each side hole of the pot (n = 4 mussels; Fig. 1). Video recording started immediately after the injection of water cue in the clay pot, at a rate of 1 frame per minute for 1h30 using a GoPro camera (GoPro HERO7 Black, GoPro Inc., San Mateo, California, USA) placed

40 cm above the experimental container. The choice of using four mussels per arena was made to minimize aggregations between mussels, which decreases with the distance between the mussels (Côté and Jelnikar., 1999; Nicastro et al., 2007).

Each day, three treatments were run concurrently : seawater (control; n = 6 arenas) and two different treatments (n = 6 arenas for each treatment; Table 1; Fig. 2). Six additional arenas using seawater as control were also performed. Thus, the sample size for each cue was : seawater n = 30 arenas; seawater with leachates n = 12 arenas and n = 6 arenas all other cues tested with and without plastic leachates (see the experimental plan; Table 1; Fig. 2). An additional control was also performed. Each mussel was only used once and then discarded, no mussels showed injury or mortality signs during the experiment.

#### 11.4. Behavioural analysis

Though we specifically chose to use of four mussels per arena to minimize the probability of occurrence of aggregation behaviour, overall four mussels ended-up as two aggregates of two mussels (*i.e.* physical contact between their shells) and two as almost-aggregated (*i.e.* at a distance of less than 2 cm). These 6 mussels represent less than 2% (*i.e.*  $6/312 \times 100$ ) of the total number of mussels used in the experiment, but could may have affected the behaviour of other mussels in the same arena (Côté and Jelnikar, 1999; Nicastro et al., 2007; Commito et al., 2014). Consequently, to avoid a potential bias related to the presence of aggregated conspecifics, the behavioural responses for the different endpoint were not studied at the level of the individual but at the level of the arena. Thus, for the different behavioural parameters studied, the data from the four mussels of each arena averaged and used as sample unit in the statistical analyses. Aggregated and almost-aggregated mussels have been included in the dataset.

First, motility was assessed by comparing the proportion of motile and non-motile mussels, to have an average percentage of mussel motility per arena. Chemokinesis was subsequently assessed through mean speed, gross distance (*i.e.* the total distance covered by the mussel between its initial and final position), net distance and confinement index (*i.e.* the ratio between net distance and gross distance) per arena. These parameters were measured only for mussels moving a net distance above 1 cm (*i.e.* approximately half mussel's shell length) using the TrackMate plugin of ImageJ (Tinevez et al., 2017). Note that the choice of a net distance greater than 1 cm was specifically made because distances less than 1 cm were assigned by TrackMate to mussels oscillating around their center of mass without actually actively moving as their foot was never observed outside their valves (see Supplementary

Materials, S4). Chemotaxis was estimated by recording the final motile mussel position with reference to the source point, in order to have an average percentage of mussels with a negative chemotaxis (repulsion from the source point) per arena.

#### 11.5. Statistical analyses

To compare differences among all treatments and to take into account the potential confounding effect of running treatments on different days, the motility, speed, gross distance, net distance, confinement index and chemotaxis of mussels, observed in the control seawater, were compared between days with an ANOVA (for more details, see Supplementary Material, S5). As no significant differences ( $p > 0.05$ ; see Supplementary Material, S5) were found among control replicates run in different days, behavioural data for each treatment from controls and treatments were pooled across days for further analyses.

Motility data were not normally distributed (Shapiro's test,  $p = 0.004$ ), but showed a homogeneity of variance (Levene's test,  $p = 0.931$ ). Parametric analysis was used based on the assumption that ANOVA is relatively robust to the effects of non-normality (Zar, 1999); therefore, data were analysed using a 2-way ANOVA with treatment (control or microplastic leachates) and cues (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors. Significant effects were examined using Tukey-HSD post-hoc test.

In order to measure the speed, gross distance, net distance, confinement index and chemotaxis, only mussels with a net distance greater than 1 cm (about half a body length) were considered, hence the sample size per treatment was : seawater n = 27, seawater with leachates n = 12 and n = 6 for the other treatments. The distribution of speed, gross distance, net distance and confinement index measurements were tested for normality (Shapiro's test,  $p = 0.00005$ ,  $p = 0.00004$ ,  $p = 0.070$ ,  $p = 0.406$ , respectively) and homogeneity of variance (Levene's test,  $p = 0.141$ ,  $p = 0.616$ ,  $p = 0.582$ ,  $p = 0.060$ , respectively). As all parameters showed a homogeneity of variance, but were not always normally distributed, parametric analyses were consistently used as described above. A 2-way ANOVA with treatment (control or microplastic leachates) and cues (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors was finally performed and significant effect were further examined using a Tukey-HSD post-hoc test.

To assess the chemotaxis, *i.e.* to compare the direction of motile mussels (with a net distance greater than 1 cm), attraction (positive chemotaxis) or repulsion (negative chemotaxis) to the source point, a 2- way ANOVA with treatment (control or microplastic leachates) and cues (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors was used, followed by a Tukey-HSD post-hoc

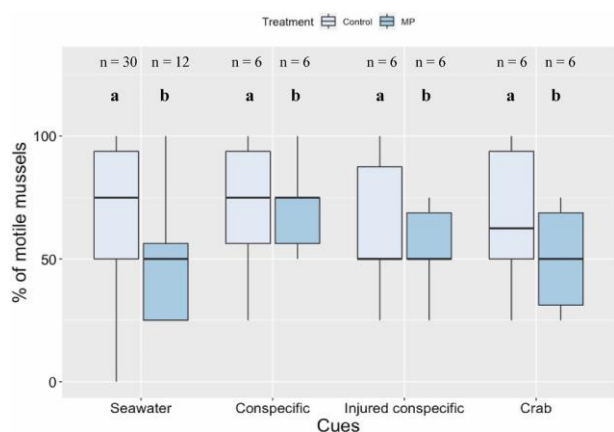
test when significant differences were identified. Prior to this test, normality ( $p = 0.013$ ) and homogeneity of variance ( $p = 0.109$ ) were measured, as homogeneity of variance was confirmed, this test could be performed (Zar, 1999). All statistical analyses were performed using the software R Core Team (2021).

## 12. Results

### 12.1. Chemokinesis

#### 12.1.1. Motility

Polypropylene leachates inhibited significantly mussel motility for all cues tested (Treatment;  $p = 0.043$ ; Fig. 3, Table 2). Specifically, a significantly higher percentage of mussels moved in the control treatment (no leachate) than when they were exposed to microplastic leachate (Tukey's test :  $p = 0.049$ ).



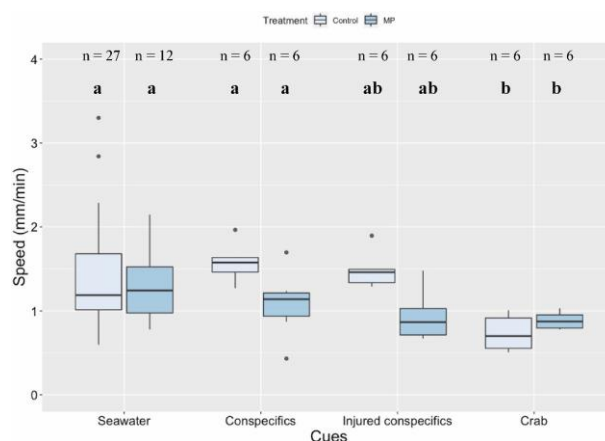
**Fig. 3.** Percentage of motile *Mytilus edulis* by replicate in control seawater and natural cue treatments (light blue) and microplastic leachates treatments (dark blue). Significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey-HSD) between treatments were identified by different letters and the number,  $n$ , of arenas used was also indicated.

**Table 2** Results of 2-way ANOVA applied to the percentage of motile mussels with Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	df	MS	F	p
Treatment	1	3066.9	4.230	0.0434
Cue	3	419.0	0.578	0.6315
Treatment $\times$ Cue	3	285.2	0.393	0.7581
Residuals	70	725.0		

#### 12.1.2. Speed

There was a significant effect of Cue (Cue;  $p = 0.005$ ; Fig. 4, Table 3). Specifically, regardless of the treatment, mussels always moved significantly slower when exposed to crab cues than when exposed to conspecifics cues or to control seawater (Tukey's test :  $p = 0.043$  and  $p = 0.002$  respectively). However, the speed of mussels exposed to conspecific cues, injured conspecific cues and control seawater did not significantly differ (Seawater; Tukey's test :  $p > 0.05$ ).



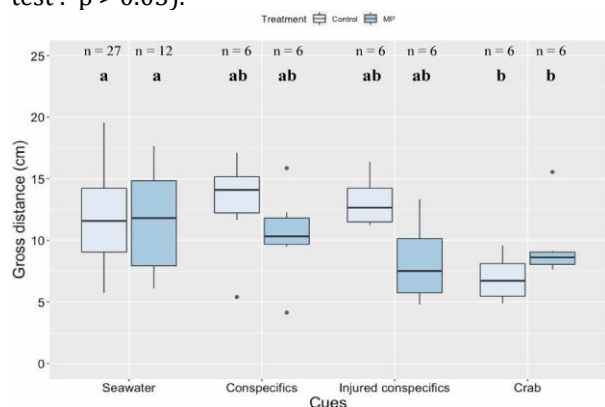
**Fig. 4.** Mean speed of *Mytilus edulis* by replicate in control seawater and natural cue treatments (light blue) and microplastic leachates treatments (dark blue). Significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey-HSD) between treatments were identified by different letters and the number of arenas used was also indicated ( $n=$ ).

**Table 3** Results of 2-way ANOVA applied to the mean speed by replicate with Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	Df	MS	F	P
Treatment	1	0.7950	3.536	0.06439
Cue	3	1.0567	4.700	0.00488
Treatment $\times$ Cue	3	0.3418	1.520	0.21723
Residuals	67	0.2248		

#### 12.1.3. Gross distance

The gross distance travelled by mussels varied significantly depending on the Cue (Cue;  $p = 0.0498$ ; Fig. 5, Table 4). Specifically, regardless of the presence of leachates, the gross distance was always lower in mussels exposed to crab cues than when exposed to sea water (Tukey's test :  $p = 0.032$  respectively). There were no significant differences for the mussel speed when exposed to conspecific cues, injured conspecific cues and the control (Seawater; Tukey's test :  $p > 0.05$ ).



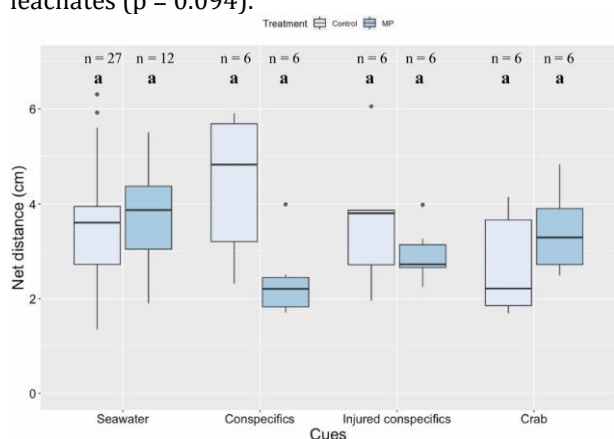
**Fig. 5.** Mean gross distance travelled by *Mytilus edulis* by replicate in control seawater and natural cue treatments (light blue) and microplastic leachates treatments (dark blue). Significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey-HSD) between treatments were identified by different letters and the number of arenas used was also indicated ( $n=$ ).

**Table 4** Results of 2-way ANOVA applied to the mean gross distance by replicate with Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	df	MS	F	p
Treatment	1	31.94	1.617	0.2080
Cue	3	54.21	2.744	0.0498
Treatment × Cue	3	30.38	1.538	0.228
Residuals	67	19.76		

#### 12.1.4. Net distance and confinement index

There was a significant effect of the Treatment × Cue interaction (Treatment × Cue;  $p = 0.036$ ; Fig. 6, Table 5). However, the Tukey's test revealed no significant differences ( $p > 0.05$ ) for the net distance travelled by mussels between every cues and treatments, even if a marginal difference was found between conspecifics with and without microplastic leachates ( $p = 0.094$ ).



**Fig. 6.** Mean net distance travelled by *Mytilus edulis* by replicate in control seawater and natural cue treatments (light blue) and microplastic leachates treatments (dark blue). Significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey-HSD) between treatments were identified by different letters and the number of arenas used was also indicated ( $n =$ ).

**Table 5** Results of 2-way ANOVA applied to the mean net distance by replicate Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	Df	MS	F	p
Treatment	1	2.031	1.360	0.2477
Cue	3	2.042	1.367	0.2604
Treatment × Cue	3	4.491	3.006	0.0363
Residuals	67	1.494		

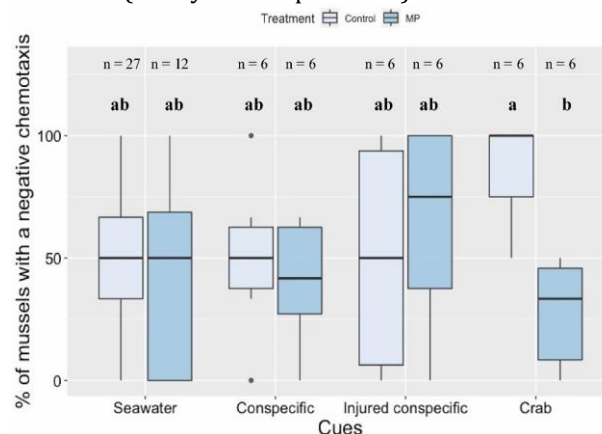
The confinement index did not differ among factors nor treatments (Table 6).

**Table 6** Results of 2-way ANOVA applied to the mean confinement index by replicate with Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	df	MS	F	p
Treatment	1	0.003253	0.257	0.614
Cue	3	0.007719	0.609	0.611
Treatment × Cue	3	0.024363	1.923	0.134
Residuals	67	0.012667		

## 12.2. Chemotaxis

There was a significant effect of the Treatment × Cue interaction on the mussel chemotaxis (Treatment × Cue;  $p = 0.038$ ; Fig. 7, Table 7), as significantly more mussels showed a negative chemotaxis to crab cue without microplastic leachates than with microplastic leachates (Tukey's test :  $p = 0.047$ ).



**Fig. 7.** Percentage of *M. edulis* moving away from the point source by replicate in control seawater and natural cue treatments (light blue) and microplastic leachates treatments (dark blue). Significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey-HSD) between treatments were identified by different letters and the number of arenas used was also indicated ( $n =$ ).

**Table 7** Results of 2-way ANOVA applied to the percentage of mussels moving away from the source point with Treatment (control or microplastic leachates) and Cue (seawater, conspecifics, injured conspecifics or crabs) as fixed factors.

Source of variation	Df	MS	F	P
Treatment	1	1976.1	1.920	0.1704
Cue	3	596.3	0.579	0.6305
Treatment × Cue	3	3051.7	2.965	0.0382
Residuals	67	1029.2		

## 13. Discussion

### 13.1. Cue-specific chemotactic and chemokinetic responses in *Mytilus edulis*

Taken together, our results show that *M. edulis* exhibit both chemotactic and chemokinetic response to chemical cues, and that these responses are cue-dependent.

#### 13.1.1. Lack of behavioural response towards conspecific cues

*Mytilus edulis* did not show any behavioural change in response to conspecific cues, in accordance with previous work on the effect of conspecific cues on *M. edulis* aggregation patterns (Commito et al., 2016). These observations are, however, in contrast with previous studies which showed that positive chemotaxis was the main driver of conspecific aggregation in bivalves (Huang et al., 2007) and in particular in *M. edulis* (De Vooy, 2003). These discrepancies may, however, be related to (i) potential behavioural divergence in *M. edulis* between those living on the bottom of a concrete ditch with



running seawater or on beach groynes as seen in Netherlands (De Vooy, 2003) with those living on natural rocky shores habitats as seen in France (present work) and/or (ii) the presence of a seasonal component in the behavioural response of *M. edulis* to conspecific cues (De Vooy, 2003). Though the identification of the mechanisms at the origin of the above-mentioned behavioural differences lies well beyond the scope of the present work, it warrants the need for further work.

### 13.1.2. Lack of behavioural response toward injured conspecifics cues

No behavioural changes were observed either in terms of chemotaxis or chemokinesis in response to injured conspecifics cues. These results are consistent with previous observations conducted on *Mytilus edulis* (Commito et al., 2016). They contrast, however, with the results of studies conducted on other mussel species, which may be indicative of a species-dependent behaviour. For instance, the motility of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) decreases in response to crushed conspecifics cues (Toomey et al., 2002; Czarnołęski et al., 2010). *Brachidontes variabilis* has been shown to adapt its behaviour when exposed to injured conspecifics by seeking and selecting the most appropriate refuges (Shin et al., 2008). Other studies showed an increase in aggregation rates, which is implicitly driven by a change in motility in both the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the brown mussel *Perna perna* in the presence of injured conspecifics (Nicastro et al., 2007).

### 13.1.3. Crab cues induce a chemokinetic and potentially a chemotactic responses in *Mytilus edulis*

*M. edulis* behaviour was significantly altered by the presence of *Hemigrapsus sanguineus* cues through a chemokinetic response. Specifically, although motility is not affected, a decrease in both gross distance and speed compared to seawater control treatment was recorded. These results are consistent with previous experiments highlighting a decrease in movement of *M. edulis* and of another intertidal mussel (*Hormomya mutabilis*) in response to predator cues (Reimer and Tedengren, 1997; Ishida and Iwasaki, 2003). These observations are consistent with the activity reduction used by many aquatic animals as an anti-predator strategy (Clements et al., 2020). Indeed, low movement in mussels decreases water motion, visibility and odour dispersal and thus the probability of being spotted by predators relying on hydrodynamical, visual and chemical cues (Ishida and Iwasaki, 2003; Garner and Litvaitis, 2013; Clements et al., 2020). In addition, our results suggest a negative chemotactic response of *M. edulis* to crab cues. This observation would be consistent with early evidence of chemodetection and chemotaxis in bivalves (Morton, 1962; De Vooy, 2003, Huang et al.,

2007). However, to our knowledge, a chemotactic response of a bivalve to its predator has yet to be documented. Here, we move a step forward by showing that *M. edulis* was able to have an adapted behaviour response to predator cues by limiting its movements and by appearing to move in the opposite direction to the source. The combination of these two complementary adaptive strategies to predator cues may provide an important defence strategy against predators and may add a short-term component to the acknowledged long-term anti-predator traits of *M. edulis*, such as its phenotypic plasticity (i.e. increase in its byssal attachment strength and the thickness of its shell following the presence of crab cues; Leonard et al., 1999; Cheung et al., 2004).

We finally stress that the chemokinetic and possible chemotactic behavioural changes observed in the native *M. edulis* in response to the invasive crab predator *H. sanguineus* indicate that *M. edulis* is not naive to this predator. Prey naiveté is a lack of its ability to recognize a new predator as a threat and subsequently develop an effective anti-predator behaviour, due to the lack of coevolution between the predator and the prey (Anton et al., 2020). The invasion of *H. sanguineus* in the eastern English Channel is relatively recent, i.e. about 16 years at our study site (Dauvin et al., 2009). The invader has now supplanted the native populations of the European green crab *Carcinus maenas* (Rolet et al., 2020). The lack of naiveté of *M. edulis* reported in the present work noticeably contrasts with observations conducted in South Africa where, 28 years after its introduction, the invasive mussel (*M. galloprovincialis*) still had not developed any anti-predator responses to cues from a native predator (the spiny lobster *Jasus lalandii*), which instead had an effect on the native mussel (*P. perna*; Nicastro et al., 2007). These observations suggest different predator-prey co-evolution history between *M. edulis* and *M. galloprovincialis*.

The overall *M. edulis* behavioural response to the different chemical cues inferred in the present work highlights a cue-specific response. Specifically, *M. edulis* responds to predatory crab cue previously fed on conspecifics (diet cue) but not to damaged released conspecific cues (alarm cue). This result is consistent with previous observation conducted on *Macoma baltica*, a marine bivalve which showed a strong response to fed crab effluents but a lack of response to injured conspecifics cues (Griffiths and Richardson, 2006). However, this behavioural response is likely to be species-dependent, as the same pattern was not observed for *Mercenaria mercenaria* (Smee and Weissburg, 2006). This observation further suggests the existence of a hierarchy in the behavioural responses. Predator cues may be a more unambiguous threat compared to crushed conspecific cues which could instead be caused by a variety of risks, such as wave action, sand,

storms, rockslides, and trampling (Zardi et al., 2006; Nicastro et al., 2019).

### 13.2. Alteration of *Mytilus edulis* chemotactic and chemokinetic responses by microplastic leachates

The addition of plastic leachates disrupted the chemotactic and/or chemokinetic behaviour of *M. edulis* from all treatments, indicating that polypropylene leachates can alter the neurosensory abilities of this species, hence its way of acquiring and processing information and therefore their decision-making.

#### 13.2.1. Microplastic leachates alter *M. edulis* chemokinetic behaviour

The percentage of non-motile mussels was significantly greater in the presence of microplastic leachates, regardless of the cues. This may be the result of an inhibition of the neuromuscular performance of *M. edulis* by polypropylene leachates. Previous studies showed a deleterious effect of plastic additives on motility of mussel D-shape larvae (*M. edulis*; Capolupo et al., 2020), fish larvae (*Danio rerio*; Kim et al., 2020), cladoceran (*Daphnia magna*; Lithner et al., 2009), drosophila (*Drosophila melanogaster*; Kaur et al., 2015), nematodes (*Caenorhabditis elegans*; Tseng et al., 2013) and rats (Vermeer et al., 2014). Thus, there is a significant effect of polypropylene leachates on mussel motility which could lead to larger scale disturbances. Indeed, any changes related to the chemosensory, referential, and behavioural abilities of *M. edulis* may have implications on their aggregation rate and consequently for the survival and reproduction of the species but also for intra- and interspecific competition for space with potentially cascading effects for coastal ecosystems (Borthagaray and Carranza, 2007; van de Koppel et al., 2008; Nicastro et al., 2012; Iwasaki, 2015; Zardi et al., 2021).

Thus, in seawater contaminated with leachates, mussels were significantly less motile than in the control seawater treatment. This contrasts with the behaviour of the mollusc *Littorina littorea*, which was not affected by the presence of leachates from virgin polypropylene microbeads, although leachates concentration was higher (ca. 10- to 100-fold higher) than in our study (Seuront., 2018). This observation highlights distinct species chemosensitivity to plastic leachates.

#### 13.2.2. Microplastic leachates alter *M. edulis* response to conspecific cues

In the present study, *M. edulis* behaviour towards conspecific cues was impacted by plastic leachates, via a decrease in their motility. There were less motile mussels, which in comparison to mussels exposed to conspecific cues without leachates, seems to cover a smaller net distance, however this last response was

not significant. This observed decrease in motility and possible smaller net distance in response to conspecific cues with leachates may impact the aggregation rate of mussels which may have larger scale spatial and ecosystem implications. However, *M. edulis* motility and aggregation rate have been shown to increase in seawater contaminated by plastic leachate (Seuront et al., 2021). Higher leachates concentration (ca.10- to 100-fold more concentrated than in our study; Seuront et al., 2021) may, however, account for this discrepancy.

#### 13.2.3. Microplastic leachates alter *M. edulis* response to injured conspecific cues

The combined signal of the injured mussels and leachates impact their chemokinetic response through a large percentage of non-motile mussels. Since no behavioural changes have been demonstrated in response to chemical cues from injured conspecifics, polypropylene leachates appear to affect the mussel itself and not its behaviour in response to injured conspecifics. Thus, the addition of leachates could lead to the reduction of motility found in the presence of injured conspecific cues.

#### 13.2.4. Microplastic leachates alter *M. edulis* response to crab cues

When exposed to a mixture of crab cue and microplastic leachates, *M. edulis* showed a significantly lower proportion of motile mussels and a significant change in direction compared to the crab cue treatment without leachates, which may result in an inhibition of its negative chemotaxis. In addition, although the gross distance and speed did not significantly differ for this treatment than for the crab cues without leachates treatment, they were significantly reduced compared to the control and control with leachates. This change in speed and distance is related to the behavioural response of the mussel to the crab and does not appear to be affected by polypropylene leachates at the concentration used in this study. However, these leachates reduce mussel motility and affect chemotaxis, the latter suggesting a neurosensory impairment rather than a neuromuscular one. This could indicate that plastic leachates may be masking the signal and/or lead to sensory deficiencies. Plastics leachates have also been reported to have neurological effect and act on the cognition of organisms in their way of acquiring and processing information and thus their decision-making (Seuront, 2018; Crump et al., 2020). For instance, the cognitive response of a prey to its predator is affected by plastic leachates in another mollusc, the gastropod *Littorina littorea* (Seuront, 2018). Indeed, the vigilance and anti-predation behaviours of gastropods (*i.e.* righting time, skioptic withdrawal, time to explore, avoidance response) have been shown to be altered and/or inhibited in the presence of plastic leachates (Seuront., 2018).

The impairments described above are in line with previous work showing that phthalates (DEHP, DBP, DIBP) can alter the neurological behaviour in nematodes (Tseng et al., 2013). Indeed, these are the dominant additives found in our polypropylene beads (Supplementary Materials, S2). Phthalates disrupt the nematode's antioxidant defence system, the morphology of some thermosensory neurons and the genes involved in this thermotaxis function (Tseng et al., 2013), altering their locomotion, *i.e.*, body bends, head thrashes, and reversal frequencies (Tseng et al., 2013). In similar fashion, these additives could induce a neurotoxicity in mussels, which would act on the neurosensory system and lead to an alteration of their movements and chemotactic capacities. A disturbance in *M. edulis* motility and neuro-sensory response could have consequences in aggregation rate and would impact the mussel growth, reproduction and anti-predator responses (Harger, 1968; Schneider et al., 2005; van de Koppel et al., 2008; Zardi et al., 2021). These impairments could lead to changes in mussel bed formations, to a decrease in mussel population and ultimately impact the ecosystem structure and functioning in *M. edulis* (Borthagaray and Carranza, 2007).

#### 14. Conclusion

Taken together, our results show that *M. edulis* behavioural responses are cue-specific. Critically, exposure to plastic leachates altered mussel behavioural responses by altering their motility. The fitness of mussels is directly related to their motility through their ability to aggregate. The impact of microplastic leachates also altered the response of mussels to conspecific cues, which is a direct link to aggregation, and to their crab predator cues. This observation indicates that chemical communication among mussels may be disrupted by plastic leachates, suggesting that aggregation rate and bed formation and also prey-predator interaction may be impacted on the short-term, at least by polypropylene leachates and at the concentration tested here which is consistent to the contamination occurring in the marine environment (*i.e.* 5 MP L<sup>-1</sup>). Prey-predator interactions are essential traits of the ecology of marine systems and variations in the ability to detect predation risk can significantly influence population and community structures (Ferrari et al., 2010). The changes caused by plastic leachates may have important effects on the bioengineering role of *M. edulis* and have cascading effects on the associated communities. Given the predicted increase in plastic pollution and the relative limited information on plastic leachates compared to plastic ingestion (Fauvelle et al., 2021), our work highlights effects of plastic leachates that may have fundamental knock-on effects on the functioning of intertidal ecosystems and the services provided to society. However, before extrapolating our results any further, it is crucial to

look at the impact of plastic leachates on the predator behaviour, to see if its predatory performance is also affected or not in a plastic-contaminated environment.

#### 15. Credit author statement

Marine Uguen : Conceptualization, Formal Analysis, Methodology, Investigation, Writing – Original Draft, Editing, Katy R Nicastro : Investigation, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing, Gerardo I Zardi : Investigation, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing, Sylvie M Gaudron : Supervision, Resources, Writing – Review & Editing, Nicolas Spilmont : Investigation, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing, Fleurine Akoueson : Methodology, Resources, Guillaume Duflos : Methodology, Resources, Laurent Seuront : Supervision, Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing, Funding acquisition.

#### 16. Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### 17. Data availability

Data will be made available on request.

#### 18. Acknowledgements

We thank J. Anquetin and A. Lutrand for their technical support. M. Uguen is funded by a PhD fellowship from the University of Lille and the Region Hauts-de-France. This research was also financially supported by both the European Maritime and Fisheries Fund (FEAMP) and France Filière Pêche through the research project SOLACE ( « Resilience of the mussel *Mytilus edulis* to anthropogenic and climatic stressors »), and by the Fundação para a Ciência e la Tecnologia (FCT, MEC, Portugal, grant number : UIDB/04326/2020) and the National Research Foundation of South Africa (grant number : 64801).

#### 19. Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135425>.

#### 20. References

- Anderson, J.C., Park, B.J., Palace, V.P., 2016. Microplastics in aquatic environments : implications for Canadian ecosystems. *Environ. Pollut.* 218, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074>.
- Anton, A., Gherardi, N.R., Ricciardi, A., Dick, J.T., 2020. Global determinants of prey naivete to exotic predators. *Proc. Royal Soc. B* 287, 20192978. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2978>, 1928.
- Arribas, L.P., Donnarumma, L., Palomo, M.G., Scrosati, R.A., 2014. Intertidal mussels as ecosystem engineers : their associated invertebrate biodiversity under contrasting wave exposures.

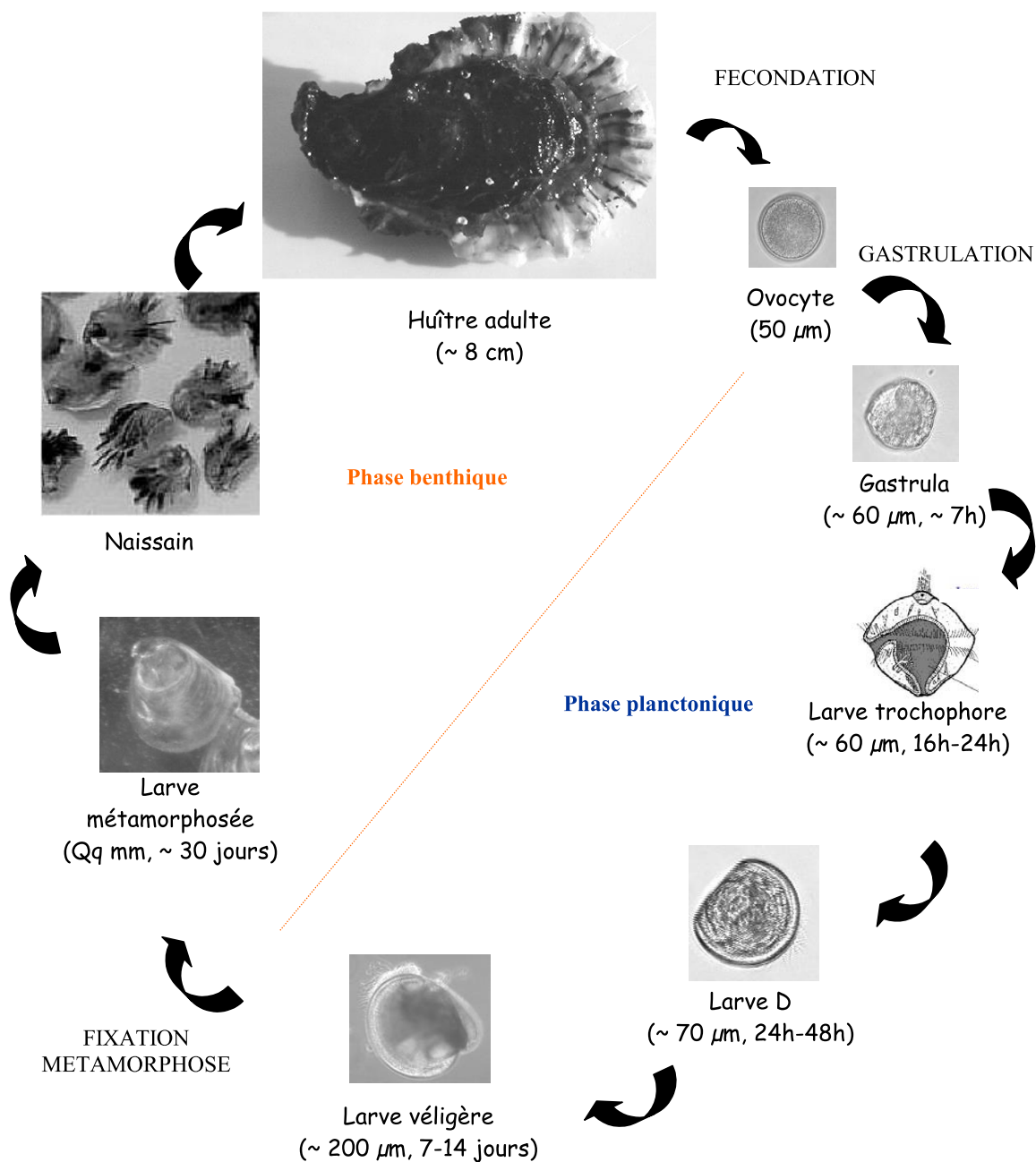
- Mar. Biodivers. 44 (2), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s12526-014-0201-z>.
- Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment : a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Int.* 102, 165–176. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(02\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00150-8).
- Bell, W.J., Tobin, T.R., 1982. Chemo-orientation. *Biol. Rev.* 57 (2), 219–260. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1982.tb00369.x>.
- Bornancin, L., Bonnard, I., Mills, S.C., Banaigs, B., 2017. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Nat. Prod. Rep.* 34 (6), 644–676. <https://doi.org/10.1039/c6np00097e>.
- Borthagaray, A.I., Carranza, A., 2007. Mussels as ecosystem engineers : their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecol.* 31 (3), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.10.008>.
- Bradbury, J.W., Vehrencamp, S.L., 1998. Principles of Animal Communication.
- Breton, G., Faasse, M., Noel, P., Vincent, T., 2002. A new alien crab in Europe : *Hemigrapsus sanguineus* (Decapoda : Brachyura : Grapsidae). *J. Crustac Biol.* 22 (1), 184–189. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990221>.
- Capolupo, M., Sørensen, L., Jayasena, K.D.R., Booth, A.M., Fabbri, E., 2020. Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Res.* 169, 115270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115270>.
- Cheung, S.G., Lam, S., Gao, Q.F., Mak, K.K., Shin, P.K.S., 2004. Induced anti-predator responses of the green mussel, *Perna viridis* (L.), on exposure to the predatory gastropod, *Thais clavigera* Küster, and the swimming crab, *Thalamita danae* Stimpson. *Mar. Biol.* 144 (4), 675–684. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1233-2>.
- Clements, J.C., Poirier, L.A., Perez, F.F., Comeau, L.A., Babarro, J.M., 2020. Behavioural responses to predators in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) are unaffected by elevated pCO<sub>2</sub>. *Mar. Environ. Res.* 161, 105148. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105148>.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment : a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>.
- Commito, J.A., Commito, A.E., Platt, R.V., Grupe, B.M., Piniak, W.E.D., Gownaris, N.J., et al., 2014. Recruitment facilitation and spatial pattern formation in soft-bottom mussel beds. *Ecosphere* 5 (12), 1–26. <https://doi.org/10.1890/ES14-00200.1>.
- Commito, J.A., Gownaris, N.J., Haulsee, D.E., Coleman, S.E., Beal, B.F., 2016. Separation anxiety : mussels self-organize into similar power-law clusters regardless of predation threat cues. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 547, 107–119. <https://doi.org/10.3354/meps11642>.
- Core Team, R., 2021. R : A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL : <https://www.R-project.org/>.
- Coté, I.M., Jelnicar, E., 1999. Predator-induced clumping behaviour in mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 235 (2), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00155-5).
- Crump, A., Mullens, C., Bethell, E.J., Cunningham, E.M., Arnott, G., 2020. Microplastics disrupt hermit crab shell selection. *Biol. Lett.* 16 (4), 20200030. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0030>.
- Czarnożęski, M., Müller, T., Adamus, K., Ogorzelska, G., Sog, M., 2010. Injured conspecifics alter mobility and byssus production in zebra mussels *Dreissena polymorpha*. *Fundam. Appl. Limnol.* 176, 269–278. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0269>.
- Dauvin, J.-C., Tous ruis, A., Ruellet, T., 2009. Recent expansion of two invasive crabs species *Hemigrapsus sanguineus* (de Haan, 1835) and *H. takanoi* Asakura and Watanabe 2005 along the Opal Coast, France. *Aquat. Invasions* 4, 451–465. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.3.3>.
- De Vooyo, C.G.N., 2003. Effect of a tripeptide on the aggregational behaviour of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 142 (6), 1119–1123. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1039-2>.
- Delaeter, C., Spilmont, N., Bouchet, V.M.P., Seuront, L., 2022. Plastic leachates : bridging the gap between a conspicuous pollution and its pernicious effects on marine life. *Sci. Total Environ.* 826, 11p. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154091>.
- Derraik, J.G., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris : a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44 (9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5).
- Dicke, M., Takken, W., 2006. Chemical Ecology. From Gene to Ecosystems. Springer.
- FAO Fishstat. <http://www.fao.org/fishery/species/2688/en>. (Accessed 30 April 2021).
- Fauvelle, V., Garel, M., Tamburini, C., Nerini, D., Castro-Jimenez, J., Schmidt, N., et al., 2021. Organic additive release from plastic to seawater is lower under deep-sea conditions. *Nat. Commun.* 12 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24738-w>.
- Ferrari, M.C., Wisenden, B.D., Chivers, D.P., 2010. Chemical ecology of predator-prey interactions in aquatic ecosystems : a review and prospectus. *Can. J. Zool.* 88 (7), 698–724. <https://doi.org/10.1139/Z10-029>.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317 (1–3), 207–233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).
- Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92 (1–2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>.
- Garner, Y.L., Litvaitis, M.K., 2013. Effects of injured conspecifics and predators on byssogenesis, attachment strength and movement in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 448, 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.07.004>.
- Griffiths, C.L., Richardson, C.A., 2006. Chemically induced predator avoidance behaviour in the burrowing bivalve *Macoma balthica*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 331 (1), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.10.002>.
- Gunaalan, K., Fabbri, E., Capolupo, M., 2020. The hidden threat of plastic leachates : a critical review on their impacts on aquatic organisms. *Water Res.* 184, 116170. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116170>.
- Harger, J.R., 1968. The role of behavioral traits in influencing the distribution of two species of sea mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Veliger* 11, 45–49.
- Huang, D., Todd, P.A., Guest, J.R., 2007. Movement and aggregation in the fluted giant clam (*Tridacna squamosa* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 342 (2), 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.051>.
- Ishida, S., Iwasaki, K., 2003. Reduced byssal thread production and movement by the intertidal mussel *Hormomya mutabilis* in response to effluent from predators. *J. Ethol.* 21 (2), 117–122. <https://doi.org/10.1007/s10164-002-0088-1>.
- Iwasaki, K., 2015. Behavior and taxis of young and adult *Limnoperna fortunei*. In : *Limnoperna fortunei*. Springer, Cham, pp. 249–260. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_14).
- Jamieson, A.J., Malkocs, T., Piertney, S.B., Fujii, T., Zhang, Z., 2017. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna. *Nat. Ecol. Evol.* 1 (3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0051>.
- Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior—A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav. Brain Res.* 284, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.001>.
- Kim, S.S., Hwang, K.S., Yang, J.Y., Chae, J.S., Kim, G.R., Kan, H., et al., 2020. Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model. *Chemosphere* 239, 124751. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.124751>.

- chemosphere.2019.124751.
- Kong, H., Clements, J.C., Dupont, S., Wang, T., Huang, X., Shang, Y., et al., 2019. Seawater acidification and temperature modulate anti-predator defenses in two co-existing *Mytilus* species. *Mar. Pollut. Bull.* 145, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.040>.
- Leonard, G.H., Bertness, M.D., Yund, P.O., 1999. Crab predation, waterborne cues, and inducible defenses in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Ecology* 80 (1), 1–14. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0001](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0001) : CPWCAI]2.0.CO, 2.
- Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H., Rotchell, J.M., 2018. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environ. Pollut.* 241, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.038>.
- Lindberg, D.R., Sigwart, J.D., 2015. What is the molluscan osphradium? A reconsideration of homology. *Zoologischer Anzeiger-J. Compar. Zool.* 256, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.001>.
- Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products—screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74 (9), 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.022>.
- Lucas, A.M., 1931. The distribution of the branchial nerve in *Mytilus edulis* and its relation to the problem of nervous control of ciliary activity. *J. Morphol.* 51 (1), 195–205. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050510105>.
- Lürling, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption : pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol. Evol.* 22 (7), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.04.002>.
- Manríquez, P.H., Jara, M.E., Gonzalez, C.P., Seguel, M.E., Domenici, P., Watson, S.A., et al., 2021. The combined effects of climate change stressors and predatory cues on a mussel species. *Sci. Total Environ.* 776, 145916 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145916>.
- McClintock, J.B., Baker, B.J., 2001. *Chemical Ecology*. CRC Press. ) Marine.
- Menge, B.A., Sutherland, J.P., 1987. Community regulation : variation in disturbance, competition, and predation in relation to environmental stress and recruitment. *Am. Nat.* 130 (5), 730–757. <https://doi.org/10.1086/284741>.
- Morton, J.E., 1962. Habit and orientation in the small commensal bivalve mollusc, *Montacuta ferruginosa*. *Anim. Behav.* 10 (1–2), 126–133. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(62\)90140-9](https://doi.org/10.1016/0003-3472(62)90140-9).
- Murlis, J., Elkinton, J.S., Carde, R.T., 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annu. Rev. Entomol.* 37 (1), 505–532. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002445>.
- Ng, T.P.T., Slatin, S.H., Davies, M.S., Hohannesson, K., Stafford, R., Williams, G.A., 2013.
- Snails and their trails : the multiple functions of trail-following in gastropods. *Biol. Rev.* 88, 683–700. <https://doi.org/10.1111/brv.12023>.
- Nicastro, K.R., Zardi, G.I., McQuaid, C.D., 2007. Behavioural response of invasive *Mytilus galloprovincialis* and indigenous *Perna perna* mussels exposed to risk of predation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 336, 169–175. <https://doi.org/10.3354/meps336169>.
- Nicastro, K.R., Zardi, G.I., McQuaid, C.D., Pearson, G.A., Serrao, E.A., 2012. Love thy neighbour : group properties of gaping behaviour in mussel aggregations. *PLoS One* 7 (10), e47382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047382>.
- Nicastro, K.R., McQuaid, C.D., Zardi, G.I., 2019. Between a rock and a hard place : combined effect of trampling and phototrophic shell-degrading endoliths in marine intertidal mussels. *Mar. Biodivers.* 49 (3), 1581–1586. <https://doi.org/10.1007/s12526-018-0924-3>.
- Ocean Conference United Nations, 2017. Factsheet : Marine Pollution. The Ocean Conference United Nations, New York. June 2017, 2p.
- Paine, R.T., Levin, S.A., 1981. Intertidal landscapes : disturbance and the dynamics of pattern. *Ecol. Monogr.* 51 (2), 145–178. <https://doi.org/10.2307/2937261>.
- Palomo, M.G., People, J., Chapman, M.G., Underwood, A.J., 2007. Separating the effects of physical and biological aspects of mussel beds on their associated assemblages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 344, 131–142. <https://doi.org/10.3354/meps07002>.
- Paul, V.J., Puglisi, M.P., Ritson-Williams, R., 2006. Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 23 (2), 153–180. <https://doi.org/10.1039/B404735B>.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., et al., 2018. Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5, 252. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252>.
- Reimer, O., Tedengren, M., 1997. Predator-induced changes in byssal attachment, aggregation and migration in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 30 (4), 251–266. <https://doi.org/10.1080/10236249709379029>.
- Reise, K., 2002. Sediment mediated species interactions in coastal waters. *J. Sea Res.* 48 (2), 127–141. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(02\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00150-8).
- Rochman, C.M., Browne, M.A., Underwood, A.J., Van Franeker, J.A., Thompson, R.C., Amaral-Zettler, L.A., 2016. The ecological impacts of marine debris : unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. *Ecology* 97 (2), 302–312. <https://doi.org/10.1890/14-2070.1>.
- Rolet, C., Becuwe, E., Terrin, S., Becuwe, F., Cerisier, H., Talleux, M., Dorth'e, S., 2020. Etat de la colonisation des Decapodes invasifs du genre ' *Hemigrapsus* sur le littoral des Hauts-de-France en 2020. Rapport du GEMEL n 20 (16), 3.
- Schneider, K.R., Wetthey, D.S., Helmuth, B.S.T., Hilbish, T.J., 2005. Implications of movement behavior on mussel dislodgement : exogenous selection in a *Mytilus spp.* hybrid zone. *Mar. Biol.* 146 (2), 333–343. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1446-z>.
- Seuront, L., 2010. Zooplankton avoidance behaviour as a response to point sources of hydrocarbon-contaminated water. *Mar. Freshw. Res.* 61 (3), 263–270. <https://doi.org/10.1071/MF0905>.
- Seuront, L., 2011. Hydrocarbon contamination decreases mating success in a marine planktonic copepod. *PLoS One* 6 (10), e26283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026283>.
- Seuront, L., 2018. Microplastic leachates impair behavioural vigilance and predator avoidance in a temperate intertidal gastropod. *Biol. Lett.* 14 (11), 20180453 <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0453>.
- Seuront, L., Nicastro, K.R., McQuaid, C.D., Zardi, G.I., 2021. Microplastic leachates induce species-specific trait strengthening in intertidal mussels. *Ecol. Appl.* 31 (1), e02222 <https://doi.org/10.1002/eap.2222>.
- Shin, P.K.S., Liu, C.C., Liu, Z.X., Cheung, S.G., 2008. Marine mussels *Brachidontes variabilis* selected smaller places of refuge and enhanced byssus production upon exposure to conspecific and heterospecific cues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 361 (1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.03.014>.
- Smee, D.L., Weissburg, M.J., 2006. Hard clams (*Mercenaria mercenaria*) evaluate predation risk using chemical signals from predators and injured conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 32 (3), 605–619. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9021-8>.
- Spilmont, N., gothland, M., Seuront, L., 2015. Exogenous control of the feeding activity in the invasive Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus* (De Haan, 1835). *Aquat. Invasions* 10 (3), 327–332. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.3.07>.
- Spilmont, N., Hachet, A., Faasse, M.A., Jourde, J., Luczak, C., Seuront, L., Rolet, C., 2018. First records of *Ptilohyale littoralis* (Amphipoda : *hyalidae*) and *Boccardia proboscidea* (Polychaeta : *spionidae*) from the coast of the English Channel : habitat use and coexistence with other species. *Mar. Biodivers.* 48 (2), 1109–1119. <https://doi.org/10.1007/s12526-016-0557-3>.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., et al., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 113 (9), 2430–2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>.
- Tabata, J., 2018. *Chemical Ecology of Insects*. Productivity Press.
- Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., et al., 2017. TrackMate : an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 115, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016>.
- Toomey, M.B., McCabe, D., Marsden, J.E., 2002. Factors affecting the movement of adult zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *J. North Am. Benthol. Soc.* 21 (3), 468–475. <https://doi.org/10.2307/1468483>.
- Tseng, I.L., Yang, Y.F., Yu, C.W., Li, W.H., Liao, V.H.C., 2013. Phthalates induce neurotoxicity affecting locomotor and thermotactic behaviors and AFD neurons through oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 8 (12), e82657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082657>.
- van de Koppel, J., Gascoigne, J.C., Theraulaz, G., Rietkerk, M., Mooij, W.M., Herman, P. M., 2008. Experimental evidence for spatial self-organization and its emergent effects in mussel bed ecosystems. *Science* 322 (5902), 739–742. <https://doi.org/10.1126/science.1163952>.
- Vermeer, L.M., Gregory, E., Winter, M.K., McCarson, K.E., Berman, N.E., 2014. Exposure to bisphenol A exacerbates migraine-like behaviors in a multibehavior model of rat migraine. *Toxicol. Sci.* 137 (2), 416–427. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft245>.
- Waite, J.H., Andersen, N.H., Jewhurst, S., Sun, C., 2005. Mussel adhesion : finding the tricks worth mimicking. *J. Adhes.* 81 (3–4), 297–317. <https://doi.org/10.1080/00218460590944602>.
- Wilkinson, P.C., 1985. Random locomotion; chemotaxis and chemokinesis. A guide to terms defining cell locomotion. *Immunol. today* 6 (9), 273–278. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(85\)90066-0](https://doi.org/10.1016/0167-5699(85)90066-0).
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zardi, G.I., Nicastrò, K.R., McQuaid, C.D., Rius, M., Porri, F., 2006. Hydrodynamic stress and habitat partitioning between indigenous (*Perna perna*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) mussels : constraints of an evolutionary strategy. *Mar. Biol.* 150 (1), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0328-y>.
- Zardi, G.I., Nicastrò, K.R., McQuaid, C.D., de Jager, M., van de Koppel, J., Seuront, L., 2021. Density-dependent and species-specific effects on self-organization modulate the resistance of mussel bed ecosystems to hydrodynamic stress. *Am. Nat.* 197 (5) <https://doi.org/10.1086/713738>.
- Zimmer, R.K., Butman, C.A., 2000. Chemical signaling processes in the marine environment. *Biol. Bull.* 198 (2), 168–187. <https://doi.org/10.2307/1542522>.
- Zippay, M.L., Helmuth, B., 2012. Effects of temperature change on mussel, *Mytilus*. *Integr. Zool.* 7, 312–327. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.00310.x>.

### Annexe 3

Cycle de développement de *C. gigas* – Issu de (Fabioux, 2004).







## **Résumé**

Les additifs plastiques, ajoutés aux polymères au cours de leurs formulations, participent aux dangers que posent l'utilisation et le rejet des plastiques dans l'environnement. Cet impact dit « chimique » a été démontré à de multiples reprises. En effet, une fois dans l'environnement, les additifs plastiques peuvent être libérés de la matrice polymérique et diffuser dans le milieu environnant. De plus, l'utilisation de certains additifs est controversée car de nombreuses molécules se sont révélées être toxiques pour les organismes et l'humain, et ont été identifiées dans l'environnement marin. Cependant, l'impact et l'étendue de cette pollution ne sont pas entièrement compris en raison du manque de méthodes capables d'analyser de manière exhaustive la grande diversité des additifs plastiques. De ce fait, l'étude des additifs plastiques suscite un intérêt croissant.

L'objectif de ces travaux de thèse est d'avoir une meilleure compréhension de l'impact chimique des additifs plastiques organiques (APOs) dans les organismes marins. Afin de répondre à cet objectif, une méthode de thermodésorption par pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse haute résolution (Py/TD-GC-HRMS) a été développée afin de pouvoir identifier une sélection d'APOs. En parallèle, une base de donnée haute résolution a été créée. Par la suite, la méthode a été appliquée pour la recherche d'APOs sur différents types d'échantillons pétro- et biosourcés dont des barquettes alimentaires en polypropylène (PP) et en acide polylactique (PLA) provenant de deux fournisseurs différents. L'analyse de ces échantillons a permis d'identifier la présence de différents additifs tels que des plastifiants (phtalates, adipates), des retardateurs de flamme phosphorés, et des antioxydants et stabilisateurs UVs (benzotriazoles et benzophénones). Au vu des additifs mis en évidence dans les échantillons et du fait de la forte présence de packaging alimentaires dans l'environnement marin, une dernière expérimentation s'est portée sur l'impact potentiel de ces additifs via l'étude de l'écotoxicité de lixiviats de ces mêmes échantillons via différents bioessais : (i) le test Microtox® sur la bactérie *A. fisheri*, et (ii) les tests de fécondation et de développement embryon-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*). Aucun effet significatif n'a été observé au cours de ces tests. Dans l'ensemble, ces travaux de thèse ont permis de proposer une méthode rapide et globale pour l'identification d'une grande diversité d'APOs dans des matrices polymériques. De plus, les résultats obtenus ont souligné l'hétérogénéité de la composition chimique en additif des matériaux plastiques entre différents fournisseurs mais également pour un polymère donné. Ceci complexifie le processus d'évaluation toxicologique ou écotoxicologique de matériaux constitués d'un même polymère pouvant avoir des profils d'additifs différents.

**Mots clés** : microplastique, additifs plastiques organiques, développement de méthode, Py/TD-GC-HRMS, bioessais

## **Abstract**

Environmental pollution from plastics and microplastics is a threat to the environment and wildlife on multiple aspects regarding exposition of different hazards. One of them is due to the chemical impact of plastic additives. The interest of studying plastic additives is growing since the use of such molecules has become controversial as many of them are considered as toxic for organisms, human beings, and have been found in the marine ecosystem. The impact and the extent of this pollution is not fully understood because of the lack of methods able to comprehensively analyze the wide diversity of plastic additives.

This PhD thesis aimed to gain a better understanding of the chemical impact of organic plastic additives (OPAs) in marine organisms. First, a general method, for identifying a selection of OPAs, was successfully developed using pyrolysis/thermal desorption-gas chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometer (Py/TD-GC-HRMS). In parallel, a high-resolution mass spectra database was implemented. Consecutively, the method was applied to characterize OPAs into petro- and biobased plastic samples including polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA) plastic containers from two distinct suppliers. The results showed that all samples contained additives including plasticizers (phthalates, adipates), phosphorus flame retardants, antioxidants and UV stabilizers (benzotriazoles and benzophenones). Considering the additives content of the samples and the high presence of plastic food containers in aquatic environment, a final experiment focused on the potential impact of these additives. To do so, the ecotoxicological profile of the leachate of these samples were investigated using *in vitro* short-term bioassays *i.e.* (i) baseline toxicity (Microtox® test) on *A. fisheri*, and (ii) Pacific oyster (*C. gigas*) fertilization success and embryo-larval development. Nevertheless, no significant toxic effects was observed upon exposure to the leachates. Overall, this work proposed a rapid and general method for the identification of a large diversity of OPAs. Furthermore, the results highlighted the heterogeneity of the chemical signatures of plastic materials between suppliers and within the same polymer. This fact complicates the toxicological and ecotoxicological assessment of plastic materials made of the same polymer that may have different additive profiles.

**Keywords** : microplastics, organic plastic additives, method developments, Py/TD-GC-HRMS, bioassay