



**HAL**  
open science

# Micro-nanoplastiques et métaux : Élaboration de modèles et propriétés de sorption en milieu naturel

Maud Gautier

► **To cite this version:**

Maud Gautier. Micro-nanoplastiques et métaux : Élaboration de modèles et propriétés de sorption en milieu naturel. Chimie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2023. Français. ⟨NNT : 2023PAUU3075⟩. ⟨tel-04709039⟩

**HAL Id: tel-04709039**

**<https://theses.hal.science/tel-04709039v1>**

Submitted on 25 Sep 2024

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.



HAL Authorization

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
École doctorale Sciences Exactes et leur Applications

Présentée et soutenue le 18 décembre 2023  
par Maud GAUTIER

Pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Spécialité : Chimie analytique et environnement

## MICRO- NANOPLASTIQUES ET MÉTAUX : ÉLABORATION DE MODELES ET PROPRIETES DE SORPTION EN MILIEU NATUREL

### MEMBRES DU JURY

#### RAPPORTRICES

- Mélanie DAVRANCHE Professeure / Université de Rennes 1
- Alexandra TER HALLE Directrice de recherche CNRS / Université Toulouse III

#### EXAMINATRICES

- Fabienne LAGARDE Maître de conférences / Université du Mans
- Sandra MOUNICOU Directrice de recherche CNRS / Université de Pau et des Pays de l'Adour

#### DIRECTEURS

- Bruno GRASSL Professeur / Université de Pau et des Pays de l'Adour
- Stéphanie REYNAUD Directrice de recherche CNRS / Université de Pau et des Pays de l'Adour





*Pour Lilian, Timéo, Loeva, Robin et Célian : quand on veut, il semblerait que l'on puisse ...*



## Remerciements

En premier lieu, je remercie toutes les personnes qui m'ont fait confiance pour réaliser un stage à leur côté et me permettre *in fine* de découvrir le monde de la recherche et de me donner confiance en moi : Lucyna Firlej, Dave Hughes, Huriye Akdas-Kiliç, Nicolas Durand, Fabienne Gauffre, Imre Varga, Mélanie Davranche, Julien Gigault, Alice Pradel, Aurélie Wahl et Florent Blancho.

Je remercie ensuite mes encadrants de thèse, Bruno Grassl et Stéphanie Reynaud pour leurs confiances, leurs encadrements, leurs disponibilités et leurs bienveillances.

Je remercie tous ceux qui m'ont été d'une aide précieuse pour prendre en main les instruments analytiques dont j'ai eu besoin : Javier Jiménez-Lamana pour la (SP)-ICP-MS, Sandra Mounicou pour la LA-ICP-MS, Virginie Pellerin pour la microscopie ainsi que Cécile Courreges pour le TOF-SIMS. Je remercie également Marisol Goni-Urriza et Claire Gassie pour les études biologiques sur les biofilms ainsi que Sabrina Lacombe pour les prestations d'imagerie TEM.

Je remercie Séverine Le Faucheur pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes expériences en mésocosmes, ainsi que ses étudiants qui m'ont aidé pour ces expériences : Mathieu Milhe-Poutingon, Sarah Gourgues et Simon Colas.

Je remercie Alexandre Holmes, Aymerick Faucher, Cloé Veclin, Lucile Marigliano, Marie-Hélène Alves, Mathilde Pucheu et Sophie Miguel pour leurs aides dans les laboratoires.

Je remercie mes très chers collègues sans qui, la pression aurait été plus compliquée à relâcher : Abir Ouri, Alexandre Holmes, Alexis Falgayrac, Arnaud Petitpas, Axelle Larrieu, Aymerick Faucher, Bastien Blanchard, Bastien Duval, Beatrice Galliano, Chloé Liebgott, Cloé Veclin, François Samalens, Gaëlle Boudier, Grégoire Lahittete, Guillaume Mageste, Léa Spitzer, Léonard Curet, Maëva Marimoutou, Marine Borg, Marion Pillet, Mathilde Pucheu, Mohamed Guesmi, Nabil Hadj Bouzidi, Quentin Palas, Robin Cellier, Sophie Miguel, Théo Reberies, Thomas Maupas et Valentina Maruzzo.

Je remercie Alexandra Ter Halle, Fabienne Lagarde, Mélanie Davranche et Sandra Mounicou d'avoir accepté de rapporter / examiner mes travaux de thèse.

Je remercie Noémie Peycelon d'avoir accepté cette plongée dans le monde scientifique en relisant ces 200 pages de manuscrit de thèse pour vous permettre, à vous lecteurs, une lecture la plus agréable possible. Également merci à Alice Pradel pour les relectures des parties rédigées en anglais.

Et enfin, je remercie mes parents de m'avoir permis d'en être là aujourd'hui.



## Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| Remerciements .....  | 5         |
| Liste des figures .....  | 11        |
| Liste des tableaux .....   | 17        |
| <b>Introduction générale</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>Chapitre 1 : Micro- nanoplastiques : origine, analyse et modèles</b> .....                                | <b>25</b> |
| Glossaire .....  | 28        |
| 1. Le plastique dans l'environnement .....   | 30        |
| 1.1. De l'avènement d'un matériau bon marché .....   | 30        |
| 1.2. ... à sa fragmentation dans l'environnement .....   | 31        |
| 1.3. Présence dans l'environnement .....   | 33        |
| 1.4. Plastique et métaux .....   | 39        |
| 2. Les méthodes analytiques pour l'analyse du plastique .....  | 42        |
| 2.1. Caractérisations de la morphologie, de la surface et des dimensions .....                               | 44        |
| 2.2. Identification chimique et quantification .....   | 47        |
| 2.3. Analyse des métaux dans les plastiques .....  | 51        |
| 3. Modèles de micro- nanoplastiques .....  | 56        |
| 3.1. Modèles non marqués .....   | 56        |
| 3.2. Modèles marqués .....   | 57        |
| <b>Chapitre 2 : Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués métalliquement</b> .....                    | <b>67</b> |
| Glossaire .....  | 71        |
| 1. Introduction .....  | 73        |
| 2. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques .....                    | 75        |
| 2.1. Synthèse des particules de PS réticulé .....  | 76        |
| 2.2. Marquage des particules de PS réticulé .....  | 83        |
| 2.3. Étude de la désorption du marqueur .....  | 87        |
| 3. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules<br>métalliques ..... | 90        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.1. Synthèse des nanoparticules d'or .....  | 91         |
| 3.2. Optimisation de la nanoprécipitation du PS.....   | 99         |
| 3.3. Marquage des particules de PS .....   | 105        |
| 4. Conclusion .....  | 119        |
| 5. Matériels et méthodes .....   | 121        |
| 5.1. Marquage par sorption d'ions métalliques .....  | 121        |
| 5.2. Marquage par encapsulation de nanoparticules métalliques.....   | 124        |
| <b>Chapitre 3 : Particules de polystyrène carboxylé pour la synthèse d'étalons plastiques pour l'analyse de métaux par ablation laser couplée ICP-MS .....</b> | <b>131</b> |
| Résumé en français .....   | 134        |
| Abstract .....   | 137        |
| 1. Introduction.....   | 139        |
| 2. Materials and methods .....   | 141        |
| 2.1. Materials.....  | 141        |
| 2.2. Elaboration of metal-doped plastic standards .....  | 141        |
| 2.3. Metal analysis.....   | 141        |
| 2.4. Nanoplastics model materials characterisations .....  | 142        |
| 2.5. Metal sorption .....  | 142        |
| 2.6. Ablation characterisation .....   | 143        |
| 3. Results and discussion .....  | 144        |
| 3.1. Trace element enrichment of carboxylated polystyrene particles .....  | 144        |
| 3.2. Metal dispersion analysis by LA-ICP-MS technique .....  | 146        |
| 4. Conclusion .....  | 150        |
| <b>Chapitre 4 : Microplastiques et biofilms, étude de l'adsorption du cobalt en mésocosmes .....</b>   | <b>153</b> |
| 1. Introduction.....   | 156        |
| 2. Matériels et méthodes .....   | 158        |
| 2.1. Matériels.....  | 158        |
| 2.2. Méthodes .....  | 159        |

|  |            |
|--|------------|
| 3. Résultats et discussions.....   | 165        |
| 3.1. Quantification du cobalt dans les microplastiques exposés en mésocosmes ..... | 166        |
| 3.2. Caractérisations de la plastisphère .....                                     | 177        |
| 3.3. Impact de la présence de biofilm sur l'adsorption du cobalt.....              | 184        |
| 4. Conclusion .....  | 188        |
| Annexes .....  | 190        |
| <b>Conclusions générales et perspectives .....</b>                                 | <b>193</b> |
| <b>Références.....</b>   | <b>199</b> |



## Liste des figures

### Chapitre 1 :

**Figure 1. 1 :** A) Nombre d'articles (ronds bleus) et de revues (losanges verts) publiés entre 2012 et 2022 et B) pourcentage d'articles (bleu) et de revues (vert) publié entre 1970 et 2022 en fonction du domaine d'étude (des publications peuvent correspondre à plusieurs domaines d'étude). Ces données ont été récupérées sur Web of Science le 13 juin 2023 avec les mots clés suivants : « ((nanoplastic\* OR microplastic\*) AND (analytical\* OR characteri\* OR identification\* OR detection\* OR (analysis AND method\*))) » ..... 43

### Chapitre 2 :

**Figure 2. 1 :** Schéma de la stratégie de l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques ..... 75

**Figure 2. 2 :** Structures d'un polymère A) non réticulé et B) réticulé. Les nœuds de réticulation sont représentés par les ronds noirs ..... 76

**Figure 2. 3 :** Images en AFM (topographie) des nanoplastiques modèles, A-C-E) PS18AADVB et B-D-F) PS18AA. PS18AADVB est composé de 18% molaire d'AA et de 3% molaire de DVB et PS18AA est composé de 18% molaire d'AA ..... 79

**Figure 2. 4 :** Evolution du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AA et de PS18AADVB avant lyophilisation et après 24h d'exposition dans différents solvants (eau MilliQ et THF). Diamètres mesurés par DLS (algorithme des cumulants) ..... 80

**Figure 2. 5 :** Evolution du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB avant lyophilisation puis exposé dans différents solvants au cours du temps. Diamètres mesurés par DLS (algorithme des cumulants). Le DMF est l'acronyme du N-N-diméthylformamide. Les résultats dans l'hexanol sont supérieurs à 1  $\mu\text{m}$  et ne sont pas représentés dans cette Figure ..... 82

**Figure 2. 6 :** Images en SEM des nanoplastiques modèles marqués A) composition élémentaire, B) cartographie élément carbone et C) cartographie élément cuivre. Crédit photo : JEOL ..... 86

**Figure 2. 7 :** Schéma des stratégies d'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques par nanopréciipitation ..... 90

**Figure 2. 8 :** Etapes de la synthèse de nanoparticules d'or en dispersion aqueuse selon la méthode de Turkevich<sup>148</sup>. A) échange de ligand, B) décarboxylation et C) réduction ..... 92

**Figure 2. 9 :** Distribution des tailles de l'échantillon Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>1,1 analysé par SP-ICP-MS. Le trait rouge hachuré représente la LOD de la mesure ..... 94

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 2. 10</b> : Evolution théorique de la densité des nanoplastiques modèles marqués en fonction du diamètre équivalent ( $d_e$ ) des nanoparticules d'or comprises entre 10 et 90 nm utilisées comme traceur pour des particules de PS de diamètre 50 nm (courbe bleue), 100 nm (courbe orange), 150 nm (courbe grise), 200 nm (courbe jaune), 250 nm (courbe verte), 300 nm (courbe violette), 500 nm (courbe marron) et > 750 nm (courbe rouge). La zone grisée correspond à une densité de modèles comprise entre 1,04 et 1,14 ..... | 95  |
| <b>Figure 2. 11</b> : Images en TEM des différentes dispersions aqueuses d'or. A-B-C) Au <sub>H2O</sub> 1,4 ; D-E-F) Au <sub>H2O</sub> 1,1 et G-H-I) Au <sub>H2O</sub> 0,9 .....   | 96  |
| <b>Figure 2. 12</b> : Distribution des tailles de l'échantillon Au <sub>THF</sub> analysé par SP-ICP-MS. Le trait rouge hachuré représente la LOD de la mesure.....  | 98  |
| <b>Figure 2. 13</b> : Images en TEM de Au <sub>THF</sub> .....   | 99  |
| <b>Figure 2. 14</b> : Schéma de la formation de particules de PS par nanopréciipitation, adapté de Rivas et al. <sup>133</sup> .....   | 100 |
| <b>Figure 2. 15</b> : Images en TEM de A) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,55 ; B) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,69 ; C) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _2,04 et D) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _10,25 .....   | 107 |
| <b>Figure 2. 16</b> : Distribution en nombre de la taille des particules de PS dans les échantillons A) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,55 et B) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,69. A : les résultats sont issus de 379 mesures sur 37 images de TEM et B : les résultats sont issus de 386 mesures sur 30 images de TEM .....  | 108 |
| <b>Figure 2. 17</b> : Distribution des tailles analysées par SP-ICP-MS de A) Au <sub>THF</sub> , B) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,55 et C) PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,69. Les traits rouges hachurés représentent les LOD des mesures.....  | 110 |
| <b>Figure 2. 18</b> : Evolution théorique de la densité des nanoplastiques modèles marqués en fonction du diamètre des nanoparticules d'or comprises entre 10 et 50 nm utilisées comme traceurs pour des particules de PS de diamètre 50 nm (courbe bleue), 100 nm (courbe orange), 150 nm (courbe grise), 200 nm (courbe jaune), 250 nm (courbe verte), 300 nm (courbe violette), 400 nm (courbe gris foncé) et 500 nm (courbe marron). La zone grisée correspond à une densité de modèles comprise entre 1,04 et 1,14.....                   | 111 |
| <b>Figure 2. 19</b> : Images en TEM d'un mélange d'or et de PS nanopréciipités séparément .....  | 112 |
| <b>Figure 2. 20</b> : Images en SEM de A) PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,25 ; B) PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,48 ; C) PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,73 et D) PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _1,21. Les images de gauche ont été analysées en mode d'analyse Darf-Field (DF), les images de droite en mode d'analyse High-Angle Annular Dark-Field (HAADF) .....  | 114 |
| <b>Figure 2. 21</b> : Images en TEM de A) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 0,9_ 0,03, B) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,1_ 0,03, C) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,4_ 0,03, D) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 0,9_ 1,66, E) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,1_ 1,66 et F) PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,4_ 1,66 .....  | 116 |

## Chapitre 3 :

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 3. 1:</b> Graphical abstract. ....   | 138 |
| <b>Figure 3. 2:</b> Adsorption isotherms of A) $\text{Cu}^{2+}$ (black circles), $\text{Mn}^{2+}$ (blue diamonds), $\text{Co}^{2+}$ (green squares) and B) $\text{Pb}^{2+}$ (red triangles) onto carboxylated polystyrene particles fitting with the Freundlich model. Freundlich equation is reported on the experimental part (Equation 1). .... | 144 |
| <b>Figure 3. 3:</b> Image of the microplastic pellets obtained by the moulding of metal sorbed nanoplastics model materials.....   | 145 |
| <b>Figure 3. 4:</b> Example of raw signals from $^{13}\text{C}$ (blue), $^{208}\text{Pb}$ (red) and $^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$ (green) obtained during LA-ICP-MS analysis on a microplastic pellet. Signal of $^{13}\text{C}$ was magnified by a factor of 10. ....   | 146 |
| <b>Figure 3. 5:</b> A) Correlation between ablation depth and number of ablations and B) Optical microscopy images of the 3 microplastic pellets of PS sorbed with $\text{Cu}^{2+}$ ablated 6, 12 and 18 times.  | 147 |
| <b>Figure 3. 6:</b> LA-ICP-MS analysis of the metal signal ( $^{63}\text{Cu}$ ) in a microplastic pellet, A) in-depth at one location and B) at 4 different locations. ....  | 147 |
| <b>Figure 3. 7:</b> Calibration curves of A) $\text{Mn}^{2+}$ , B) $\text{Co}^{2+}$ (green squares) and $\text{Cu}^{2+}$ (black circles), C) $\text{Pb}^{2+}$ and D) RSD values.....   | 149 |

## Chapitre 4 :

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 4. 1 :</b> Photos des microplastiques utilisés dans cette expérience : A) HDPE, B) PP et C) PS. Barres d'échelle 10 mm.....  | 158 |
| <b>Figure 4. 2 :</b> Schéma de l'installation des rivières pilotes du PERL à Lacq, France. (1) barrage, (2) débitmètre, (3) contrôle du débit, (4) « nurserie », (5) ouvrage de distribution de l'eau, (6) surverses amont, (7) pompes d'injection, (8) rivières pilotes, (9) sondes physico-chimiques, (10) et (11) surverses aval. Les flèches indiquent la direction de l'écoulement de l'eau. Schéma issu de Sourisseau <i>et al.</i> <sup>187</sup> ..... | 160 |
| <b>Figure 4. 3 :</b> Expériences en mésocosmes, A) et B) boîte en plastique contenant les cordons de microplastiques, C) boîte contenant les échantillons placée dans un mésocosme et D) mésocosmes .....  | 162 |
| <b>Figure 4. 4 :</b> Diagramme de fréquence des diamètres de Feret d'environ 300 granules des microplastiques utilisés dans cette étude (bleu ciel : PS, bleu : PP et bleu marine : HDPE).....   | 165 |
| <b>Figure 4. 5 :</b> Photographie d'un granulé de microplastique type PP A) avant exposition et B) après exposition en mésocosmes pendant 28 jours.....  | 166 |
| <b>Figure 4. 6 :</b> Concentrations totales en cobalt déterminées par ICP-MS dans les échantillons de PP exposés en mésocosmes à une concentration en cobalt de 6 (ronds vert clair), 30 (losanges verts) et 60 (carrés vert foncé) $\mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition .....  | 169 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 4. 7</b> : Exemples de signaux bruts du $^{13}\text{C}$ (jaune), $^{59}\text{Co}$ (orange) et $^{59}\text{Co}/^{13}\text{C}$ (rouge) obtenus au cours d'une analyse en LA-ICP-MS. Ces signaux ont été obtenus sur un PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ .....   | 171 |
| <b>Figure 4. 8</b> : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP (ronds bleus), PS (losanges bleu ciel) et PE (carrés bleu marine) exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction du nombre d'ablations.....   | 172 |
| <b>Figure 4. 9</b> : Concentrations en cobalt, déterminées par LA-ICP-MS en calibrant le signal avec les étalons de plastique développés au Chapitre 3, dans les échantillons de PP (ronds bleus), PS (losanges bleu ciel) et PE (carrés bleu marine) exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction du nombre d'ablations .....  | 172 |
| <b>Figure 4. 10</b> : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés 28 jours dans le mésocosme 7 (ronds jaunes) et 11 (losanges marron) à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition.....  | 174 |
| <b>Figure 4. 11</b> : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés dans le mésocosme 7 à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition. Analyses à trois endroits différents de l'échantillon et calcul des écarts-types.....  | 175 |
| <b>Figure 4. 12</b> : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés en mésocosmes à une concentration en cobalt de 6 (ronds vert clair), 30 (losanges verts) et 60 (carrés vert foncé) $\mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition .....  | 176 |
| <b>Figure 4. 13</b> : Images en SEM de (A-C-E) un PP avant exposition et (B-D-F) un PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ . Des images supplémentaires sont disponibles en Annexe 3.....   | 177 |
| <b>Figure 4. 14</b> : Quantités d'ADN extrait sur 9 granulés de microplastiques exposés en mésocosmes par qPCR. A) sur du PP exposé 28 jours en fonction de la concentration d'exposition, B) sur du PP exposé à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition et C) sur des microplastiques exposés 28 jours à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction du polymère ..... | 179 |
| <b>Figure 4. 15</b> : Nombre de copies d'ADN extraits sur 9 granulés de microplastiques exposés en rivières pilote par qPCR sur des échantillons de type PP exposés à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition .....  | 181 |
| <b>Figure 4. 16</b> : Analyses SEM-EDS d'un échantillon de PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ A) d'une zone avec peu de biofilm et B) d'une zone riche en biofilm. Images des zones analysées, spectres de rayon X et identification des éléments et tableaux des résultats de la quantification des éléments identifiés.....   | 183 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 4. 17</b> : Images en SEM d'un PP exposé 28 jours en eau de rivière synthétique à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ .....   | 185 |
| <b>Figure 4. 18</b> : Analyses en LA-ICP-MS d'un échantillon de PP exposé 28 jours en mésocosmes (violet) et en eau de rivière synthétique (gris) à une concentration en cobalt de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ..... | 186 |



## Liste des tableaux

### Chapitre 1 :

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1. 1 :</b> Liste des propriétés des principaux additifs métalliques retrouvés dans les plastiques (issue de la référence : <sup>75</sup> ).....          | 39 |
| <b>Tableau 1. 2 :</b> Résolution des principales techniques de microscopie pour l'analyse des micro-nanoplastiques .....  | 44 |
| <b>Tableau 1. 3 :</b> Caractéristiques des principaux modèles de micro-nanoplastiques marqués métalliquement et matrices dans lesquelles ils ont été utilisés ..... | 63 |

### Chapitre 2 :

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 2. 1 :</b> Caractéristiques physico-chimiques de PS18AADVB et de PS18AA. Diamètres ( $d_H$ ) déterminés par DLS (algorithme des cumulants), concentrations déterminées par méthode gravimétrique, potentiels zêta déterminés par zétamétrie et quantités de COOH en surface déterminées par dosage acido-basique .....  | 78 |
| <b>Tableau 2. 2 :</b> Caractérisation du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB et de PS18AA avant lyophilisation et après 24h d'exposition dans différents solvants (eau MilliQ et THF) par DLS (algorithme des cumulants).....  | 80 |
| <b>Tableau 2. 3 :</b> Caractérisation du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB exposé dans différents solvants au cours du temps par DLS (algorithme des cumulants). Le DMF est l'acronyme du N-N-diméthylformamide.....   | 81 |
| <b>Tableau 2. 4 :</b> Concentrations en cuivre théoriques nécessaires pour l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption de cuivre métallique .....  | 84 |
| <b>Tableau 2. 5 :</b> Etude de la saturation en $Cu(NO_3)_2$ dans le DMF et le THF.....  | 84 |
| <b>Tableau 2. 6 :</b> Masses de cuivre théoriques par nanoplastique modèle en fonction du coefficient de partage $\alpha$ , en exposant 10 mg de PS18AADVB dans 10 mL de DMF contenant 0,1 mg de cuivre .....  | 85 |
| <b>Tableau 2. 7 :</b> Caractéristiques physico-chimiques de $Au_{H_2O\_1,4}$ ; $Au_{H_2O\_1,1}$ ; $Au_{H_2O\_0,9}$ et $Au_{H_2O\_0,6}$ . Diamètres équivalents ( $d_E$ ) déterminés par DLS (algorithmes des cumulants et SBL) et SP-ICP-MS, résonances plasmoniques de surface (RPS) déterminées par spectroscopie UV-visible et concentrations en nanoparticules et masses d'or par nanoparticule déterminées par SP-ICP-MS. Pour les diamètres déterminés par DLS avec l'algorithme SBL les proportions de chaque population retrouvée sont données entre parenthèses ..... | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 2. 8</b> : Caractéristiques physico-chimiques de Au <sub>THF</sub> . Diamètre équivalent ( $d_E$ ) déterminé par SP-ICP-MS, résonance plasmonique de surface (RPS) déterminée par spectroscopie UV-visible et concentration en nanoparticules et masse d'or par nanoparticule déterminée par SP-ICP-MS.....  | 97  |
| <b>Tableau 2. 9</b> : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des dispersions obtenues par nanopréciipitation d'une solution de PS dans du THF à 10 g L <sup>-1</sup> dans V <sub>H2O</sub> = 16 mL en fonction du ratio V <sub>THF</sub> / V <sub>H2O</sub> . Les diamètres ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants).....  | 101 |
| <b>Tableau 2. 10</b> : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des dispersions obtenues par nanopréciipitation en fonction du mode d'évaporation du THF à un ratio V <sub>THF</sub> / V <sub>H2O</sub> = 1 : 6 d'une solution de PS dans du THF à 10 g L <sup>-1</sup> dans V <sub>H2O</sub> = 32 mL. Les diamètres ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants)...   | 102 |
| <b>Tableau 2. 11</b> : Etude de la faisabilité de la nanopréciipitation sur des PS de différentes natures dans les conditions suivantes : concentration en PS de 10 g L <sup>-1</sup> , ratio V <sub>THF</sub> / V <sub>H2O</sub> 1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de 2 mL s <sup>-1</sup> . Les masses molaire moyennes ( $M_n$ ) et les dispersités ( $\mathcal{D}$ ) ont été déterminées par CES et les diamètres ( $d_H$ ) et les polydispersités (PDI) par DLS (algorithme des cumulants).....   | 104 |
| <b>Tableau 2. 12</b> : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des nanopréciipitations de PS18AA dans de l'eau et des co-nanopréciipitations d'or et de PS18AA dans de l'eau en fonction des ratios Au/PS, dans les conditions de nanopréciipitation suivantes : ratio V <sub>THF</sub> / V <sub>H2O</sub> 1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de 2 mL s <sup>-1</sup> . Les diamètres ( $d_H$ ) ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants et SBL). Pour les diamètres mesurés par DLS avec l'algorithme SBL les proportions de chaque population retrouvée sont données entre parenthèses ..... | 106 |
| <b>Tableau 2. 13</b> : Co-nanopréciipitation d'or et de PS18VBA dans de l'eau : ratios étudiés dans les conditions de nanopréciipitation suivantes : ratio V <sub>THF</sub> / V <sub>H2O</sub> 1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de 2 mL s <sup>-1</sup> .....   | 112 |
| <b>Tableau 2. 14</b> : Nom des échantillons des dispersions de PS nanopréciipitées dans des dispersions aqueuses de nanoparticules d'or. Les noms des échantillons en italique et de couleur bleue correspondent aux échantillons caractérisés en TEM .....   | 115 |
| <b>Tableau 2. 15</b> : Pourcentages molaires ( $^n/n$ ) ou massiques ( $^w/w$ ) des réactifs dans la synthèse des particules de PS réticulé.....  | 122 |

### Chapitre 3 :

|   |     |
|---|-----|
| <b>Table 3. 1:</b> Isotherm parameters calculated by fitting the results with the Freundlich model. Freundlich equation is reported on the experimental part (Equation 1). $K_{ads}$ corresponds to the Freundlich adsorption constant at the equilibrium, $n$ to the non-linearity coefficient and $R^2$ to the correlation coefficient (see experimental part, Equation 1)..... | 145 |
|---|-----|

## Chapitre 4 :

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 4. 1 :</b> Correspondance du numéro du mésocosme et des concentrations d'exposition en cobalt.....   | 161 |
| <b>Tableau 4. 2 :</b> LOD et LOQ du signal analytique en ICP-MS du cobalt en CPS et en concentration en cobalt et analyses des échantillons de microplastiques avant exposition en mésocosmes .....   | 166 |
| <b>Tableau 4. 3 :</b> Concentrations totales en cobalt déterminées par ICP-MS dans les échantillons de microplastiques exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ en fonction du numéro du mésocosme ..... | 167 |
| <b>Tableau 4. 4 :</b> Concentrations en cobalt déterminées par ICP-MS dans les mésocosmes (M) 7, 11 et 12 en fonction du temps .....  | 168 |
| <b>Tableau 4. 5 :</b> LOD et LOQ du signal analytique en ICP-MS du cobalt et analyses des échantillons de microplastiques exposés 28 jours en eau de rivière synthétique à une concentration en cobalt de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....                 | 185 |



---

## **Introduction générale**

Aujourd'hui, le plastique s'est immiscé dans tous les aspects de notre vie. Dès le réveil, avec l'utilisation de produits d'hygiène puis l'habillage et le rituel matinal qui inclut le traditionnel café ou thé conditionné et préparé dans du plastique. Pour se rendre au travail, on retrouve du plastique dans les véhicules motorisés et non motorisés. Deux heures après le réveil, nous avons ainsi côtoyé une longue liste de plastiques qu'il soit à usage unique (emballage) ou à haute performance (vêtements, bouilloires, pare-chocs de véhicule, ...). Le plastique est donc omniprésent dans notre quotidien et ... dans l'environnement.

Depuis 2016, il est courant d'entendre que d'ici 2050, la masse de plastique dans les océans sera supérieure à celle des poissons qui y vivent. Or le plastique qui se retrouve dans l'environnement, sous l'effet du soleil, de l'abrasion ou de frottements, se fragmente en des particules de plus en plus petites. Cette fragmentation conduit de fait à la dissémination de milliards de microplastiques et de nanoplastiques dans tous les compartiments environnementaux et réseaux trophiques. Il est de fait urgent d'étudier le devenir, le comportement et l'impact de ces polluants sur les écosystèmes. Le plastique est un matériau constitué d'une matrice polymère mélangée à des additifs. Les additifs ajoutés peuvent être de nature métallique, organo-métallique ou organique et permettent de moduler les propriétés du plastique en le rendant plus résistant à l'oxydation, aux microorganismes ou en le colorant par exemple. Intrinsèquement donc, ce matériau contient des additifs potentiellement toxiques. Mais il a été montré que les plastiques secondaires (retrouvés dans l'environnement) sont également capables d'adsorber des polluants présents dans leur milieu puis de les transporter et de les disséminer dans un autre milieu, phénomène appelé effet Cheval de Troie.

Se pose alors la question des conséquences de la dissémination de ce plastique sur les équilibres et les organismes de nos écosystèmes. Afin de répondre à ces questionnements, les recherches visent à comprendre le comportement de ces polluants, en termes de transport, d'accumulation, d'interactions et de toxicité. Pour cartographier la présence de plastiques dans l'environnement, les chercheurs ont recours à des prélèvements et à de la modélisation visant à caractériser leur accumulation dans les différents compartiments environnementaux et réseaux trophiques. Pour étudier les interactions de ces polluants avec les organismes vivants et ainsi déterminer leurs toxicités ce sont généralement des études en laboratoire qui sont réalisées. Pour ces dernières, c'est vers des modèles de micro-nanoplastiques que les chercheurs se tournent. Ces matériaux modèles doivent être représentatifs des micro- nanoplastiques environnementaux, avec par exemple, des distributions en taille polydisperses, des formes polymorphiques et une surface oxydée présentant des aspérités. Dans le but de faciliter le suivi et la quantification de ces modèles, de plus en plus de protocoles de synthèse proposent

d'intégrer un traceur dans ces modèles. Ce traceur, de nature différente de la matrice polymère permet d'identifier plus facilement le modèle à des concentrations environnementales et dans des matrices complexes. Ces recherches s'appuient sur des développements analytiques pour lesquels la communauté scientifique s'accorde sur le manque de matériaux de référence utiles pour valider ces méthodes.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux était double tout en gardant à l'esprit la dualité entre micro-nanoplastiques et métaux. Le premier objectif a été d'élaborer des plastiques modèles, d'une part, des nanoplastiques marqués avec un traceur métallique et d'autre part, des étalons de microplastiques pour la quantification de métaux sorbés à la surface de plastique secondaire par ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (LA-ICP-MS). Le second objectif a été d'étudier la sorption de métaux sur des microplastiques primaires en milieu naturel par l'utilisation de mésocosmes de rivière naturelle.

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre chapitres.

Le **Chapitre 1** est un état de l'art de la problématique plastique dans l'environnement. Il présente l'utilisation des premières matières plastiques naturelles puis le développement des matières plastiques 100% synthétiques qui a conduit à les rendre indispensables aujourd'hui. Leur présence dans l'environnement et leur dissémination en débris de petites tailles sont discutées *via* les mécanismes de fragmentation qu'ils peuvent subir dans l'environnement. Dans les milieux naturels, les plastiques étant exposés à des polluants déjà présents, une partie décrit la capacité de ces polluants à sorber des métaux à la manière d'un Cheval de Troie. Pour comprendre toutes ces étapes, les outils dont les chercheurs disposent sont décrits avec les méthodes analytiques développées pour la caractérisation, l'identification et la quantification. Enfin, la dernière partie présente les principaux modèles de micro-nanoplastiques sur lesquels les chercheurs peuvent s'appuyer pour réaliser leurs études.

Le **Chapitre 2** présente nos stratégies pour l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués métalliquement ainsi que leurs caractérisations. La première stratégie étudiée est le développement d'un nanoplastique réticulé obtenu par polymérisation en émulsion sans tensio-actif. Ces nanoplastiques sont mis à gonfler dans un bon solvant du polymère, en présence d'un métal ionique. Les modèles marqués sont obtenus par diffusion du métal au cœur des nanoplastiques lors du gonflement. La seconde stratégie repose sur l'encapsulation par un procédé de nanopréciipitation de nanoparticules d'or dans des chaînes de polymère également synthétisées par polymérisation en émulsion sans tensio-actif. Cette encapsulation doit ainsi permettre de maintenir le traceur dans la structure du modèle.

Le **Chapitre 3** vise à développer des matériaux composés d'une matrice polymère au sein de laquelle des métaux sont répartis de façon homogène pour servir d'étalons pour les méthodes analytiques. Ces matériaux étalons sont destinés à la calibration des techniques analytiques pour la quantification des métaux en subsurface de plastique secondaire. Dans nos travaux, nous avons choisi d'utiliser l'ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (LA-ICP-MS) pour valider nos matériaux. Ce développement, qui s'appuie sur les résultats du chapitre précédent, repose sur l'absorption de métaux à des concentrations définies dans des nanoplastiques modèles qui sont ensuite moulés sous forme de pastilles contenant des concentrations en métaux variables. Ce chapitre est rédigé sous format publication, un résumé en français le précède.

Le **Chapitre 4** se focalise sur l'étude de la sorption de métal dans des échantillons de microplastiques (PE, PP et PS). Cette étude a été réalisée en conditions environnementales dans des rivières pilotes dans lesquelles le flux d'eau a été adjuvé d'un métal, un sel de cobalt, à quatre concentrations différentes. Dans nos travaux, le cobalt a été choisi car il est une source de pollution croissante des écosystèmes du fait de sa présence dans les batteries lithium-ion. L'expérience a été réalisée pendant un mois avec des prélèvements hebdomadaires. Grâce à tous ces paramètres, la sorption de métal a pu être étudiée en fonction de la nature du microplastique, de la concentration d'exposition en cobalt et de la durée d'exposition. Par ailleurs, grâce à ces conditions environnementales, le rôle du biofilm dans la sorption de métal par les microplastiques a pu être identifié.

Une conclusion générale clôt ce manuscrit.

Cette thèse est rattachée au projet PlastiTrack financé par la région Nouvelle-Aquitaine.



## **Chapitre 1 : Micro- nanoplastiques : origine, analyse et modèles**



## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Glossaire .....   | 28 |
| 1. Le plastique dans l'environnement .....                                    | 30 |
| 1.1. De l'avènement d'un matériau bon marché .....                            | 30 |
| 1.2. ... à sa fragmentation dans l'environnement .....                        | 31 |
| 1.3. Présence dans l'environnement.....                                       | 33 |
| 1.3.1. Compartiments environnementaux.....                                    | 33 |
| 1.3.2. Réseaux trophiques.....  | 35 |
| 1.3.3. Concentrations environnementales.....                                  | 37 |
| 1.4. Plastique et métaux.....   | 39 |
| 2. Les méthodes analytiques pour l'analyse du plastique .....                 | 42 |
| 2.1. Caractérisations de la morphologie, de la surface et des dimensions..... | 44 |
| 2.2. Identification chimique et quantification.....                           | 47 |
| 2.3. Analyse des métaux dans les plastiques .....                             | 51 |
| 3. Modèles de micro- nanoplastiques .....                                     | 56 |
| 3.1. Modèles non marqués.....   | 56 |
| 3.2. Modèles marqués.....   | 57 |
| 3.2.1. Marquages fluorescent et isotopique .....                              | 57 |
| 3.2.2. Marquage métallique .....  | 59 |

## Glossaire

μ-FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier couplée à la microscopie

μ-Raman : spectroscopie Raman couplée à la microscopie

AF4 : fractionnement par couplage flux – force à flux croisés

AFM : microscopie à force atomique

ATR-FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflectance totale atténuée

DLS : diffusion dynamique de la lumière

EDS : spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

fg : femtogramme,  $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HDPE : polyéthylène haute densité

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

LA-ICP-MS : ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

LDPE : polyéthylène basse densité

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

MP : microplastique

NP : nanoplastique

NTA : analyse du suivi des particules

PA-6 : Nylon 6

PAN : polyacrylonitrile

PC : polycarbonate

PET : polytéréphtalate d'éthylène

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

PP : polypropylène

PS : polystyrène

PTFE : polytétrafluoroéthylène

PVC : polychlorure de vinyle

Pyr-GC-MS : pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse

RT : spectroscopie Raman à pinces optiques

SBL : Sparse Bayesian Learning

SC-ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode cellule unique

SEM : microscopie électronique à balayage

SP-ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique

TED-GC-MS : thermo-extraction désorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse

TEM : microscopie électronique à transmission

TGA : analyse thermogravimétrique

THF : tétrahydrofurane

TOF-SIMS : spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol

XPS : spectroscopie de photoélectrons à rayons X

## 1. Le plastique dans l'environnement

### 1.1. De l'avènement d'un matériau bon marché ...

Les premières traces de l'utilisation de matières plastiques remontent à 1600 ans avant J.C. avec l'usage d'objets en caoutchouc naturel. À cette époque, l'ancien peuple méso-américain récoltait du latex du *Castilla elastica* qu'il mélangeait ensuite avec la sève d'une autre plante, la *Ipomoea alba* permettant la synthèse de caoutchouc. Ce dernier était ainsi utilisé pour la fabrication de balles, de figurines et d'élastiques permettant le maintien des têtes de haches sur les manches en bois<sup>1</sup>. La mise au point de balles en caoutchouc a ainsi mené à la naissance du jeu de balle (*pitz* en maya classique), un sport rituel pratiqué pendant plus de 3000 ans par ce peuple méso-américain. Le mécanisme chimique régissant la création de ces balles en caoutchouc, du nom de vulcanisation, a été défini par les scientifiques seulement 3400 ans plus tard, au XIX<sup>ème</sup> siècle<sup>2</sup>. C'est d'ailleurs ce siècle qui marque le début de la science et de l'étude des polymères.

En 1862, Alexander Parkes présente ses premiers échantillons de Parkésine à l'exposition internationale de Londres. Ce polymère, synthétisé à partir de cellulose de végétaux, est un matériau dur mais flexible, capable d'être moulé, sculpté, peint, et résistant à l'eau. Huit années plus tard, John Wesley Hyatt invente le celluloïd dans le but de fabriquer des boules de billard et ainsi remplacer l'ivoire, matériau qui se raréfie et dont l'usage conduit à décimer les populations d'éléphants.

A partir du XX<sup>ème</sup> siècle apparaissent des matières plastiques entièrement synthétiques. La percée décisive revient au chimiste Léo Baekeland qui, en 1907, créa la bakélite. Ce matériau durable aux nombreuses propriétés isolantes et thermorésistantes sera produit à l'échelle industrielle dès 1927 et pourra ainsi remplacer des matériaux comme la porcelaine, le bois ou le métal et sera même utilisé comme isolant électrique. En 1926, c'est au tour du polychlorure de vinyle (PVC) de faire son essor, avec la mise au point d'une méthode de plastification de ce polymère permettant de le rendre flexible, souple et facile à fabriquer, faisant de lui une alternative sans précédent au caoutchouc classique. Quatre années plus tard, le polystyrène (PS) est inventé et en 1944, le PS expansé est découvert par hasard et sera utilisé comme isolant thermique dans les bâtiments. En 1935, une entreprise américaine vante les mérites d'une fibre « aussi solide que l'acier, aussi fine que la toile d'araignée, et d'un magnifique éclat », il s'agit alors ni plus ni moins que du polyamide qui sera utilisé, entre autres, dans la confection de collants et de parachutes. Peu de temps après, en 1938, c'est un matériau présentant d'excellentes résistances chimique et thermique qui voit le jour, le polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou Teflon. Ce matériau servira dans un premier temps dans l'industrie nucléaire avant de, par exemple, recouvrir les poêles à frire du fait de son pouvoir antiadhésif.

C'est à partir des années 1940 et notamment à la fin de la seconde guerre mondiale que le plastique investit tous les foyers, remplaçant petit à petit toutes les matières traditionnelles, en raison de ses

usages très variés. Sont ainsi retrouvés : le mélamine-formaldéhyde (Formica) pour les meubles, les polyester pour les vêtements, le polyéthylène haute densité (HDPE) pour l'emballage rigide, le polyéthylène basse densité (LDPE) dans l'emballage souple ou encore le polycarbonate (PC) dans les casques d'astronaute et le polypropylène (PP) dans le secteur automobile. Depuis cette période, la production et la consommation de plastique n'a cessé d'augmenter.

Ainsi, il est estimé qu'entre 1950 et 2015, pas moins de 8 300 millions de tonnes de résines et de fibres plastiques ont été fabriquées<sup>3</sup>. Pour les années 2016 à 2021, c'est 2 048 millions de tonnes produites<sup>4,5</sup>. La lecture de ces nombres vertigineux amène la question suivante : quel sort est réservé à ce matériau après usage ?

### 1.2. ... à sa fragmentation dans l'environnement

C'est en 2017 que, Geyer *et al.* ont réalisé la première analyse globale de tout le plastique produit sur Terre à l'aide d'un modèle de flux de matières prenant en compte les données en terme de production, d'utilisation et du devenir du matériau en fin de vie<sup>3</sup>. Les données portent ainsi le plastique au rang de matériau le plus produit à l'exception des matériaux utilisés dans le bâtiment comme le ciment ou l'acier. En 2015, ils ont estimé que 6 300 millions de tonnes de déchets plastiques ont été produites depuis 1950 à travers le monde et que 9% ont été recyclées, 12% incinérées et 79% jetées dans des décharges ou dans l'environnement. Une étude de Lase *et al.*<sup>6</sup> publiée en 2023 prévoit des taux de recyclage en Europe qui pourraient être bien supérieurs à ces 9% et pourraient atteindre jusqu'à 61% d'ici 2030, des efforts sur le recyclage de ce matériau sont donc amorcés.

Les quantités retrouvées à ce jour dans l'environnement sont très importantes à tel point que le terme de « Septième continent » voit le jour dès 1997. C'est cette année-là que le navigateur Charles Moore découvre une vaste zone au milieu du Pacifique dans laquelle des tourbillons de débris translucides sont en suspension et représentent à l'époque, 300 000 déchets par km<sup>2</sup>. Cette zone se situe dans le gyre du Pacifique nord et elle est depuis renommée le gyre de déchets du Pacifique nord ou Great Pacific Garbage Patch. En 2018, grâce à un modèle calibré avec des données provenant d'enquêtes réalisées par bateaux et par avions, Lebreton *et al.*<sup>7</sup> ont estimé que cette zone d'accumulation est composée de 1 800 milliards de fragments de plastiques représentant 80 000 tonnes de plastiques flottant sur une zone de 1,6 millions de km<sup>2</sup>. Par rapport aux données de 1997 qui estimaient le nombre de déchet dans cette zone à 300 000 par km<sup>2</sup>, en 2018, il y en aurait ainsi près de 4 fois plus. Parmi tous ces déchets, 94% d'entre eux ont une taille de l'ordre du micromètre. Ces petits plastiques sont devenus une source d'intérêt majeur et le terme de microplastiques a été proposé afin de définir clairement ces particules. Les microplastiques (MP) ont été définis en 2019 par Frias *et Nash*<sup>8</sup> comme étant des particules solides de plastiques de tailles comprises entre 1 et 5000 µm. Parmi ces particules, la

première classe de microplastiques retrouvée est celle dite primaire, c'est-à-dire conçue à l'origine pour avoir cette taille comme les granulés de plastiques utilisés dans la plasturgie (les « larmes de sirène ») ou les microbilles utilisées comme exfoliants. L'autre classe de microplastiques est celle dite secondaire qui provient de la fragmentation ou de l'abrasion d'objets plus volumineux. Et la fragmentation ne s'arrête pas là.

En effet, en faisant le bilan de masse du plastique qui devrait se retrouver à la surface des océans selon les taux de rejet dans l'environnement, Cozar *et al.*<sup>9</sup> ont montré un manque considérable, de l'ordre de 99% par rapport à ce qui a été estimé flotter dans les océans selon des mesures et de la modélisation. Les auteurs ont émis quatre hypothèses pour expliquer ce manque, la nanofragmentation, l'ingestion par des organismes vivants, l'encrassement biologique qui conduit à la sédimentation, et le dépôt sur le littoral. Étant donné que les mesures se sont focalisées sur les particules de plastiques visibles, dont la taille est comprise entre 0,3 et 10 mm, le défaut dans le bilan de masse peut effectivement s'expliquer par la présence de plastiques de tailles nanométriques non visibles et donc difficilement caractérisables par les méthodes d'échantillonnage et les techniques d'analyses conventionnelles. Partant de ce constat, des chercheurs<sup>10,11</sup> se sont intéressés à cette fraction et ont effectivement mis en évidence des mécanismes de fragmentation nanométrique. Ainsi, les nanoplastiques (NP) ont été définis comme étant des particules de plastique qui se sont dégradées jusqu'à atteindre des tailles comprises entre 1 et 1000 nm présentant un comportement colloïdal et qui se retrouvent donc dans l'environnement de façon non intentionnelle<sup>10</sup>.

Une pièce de plastique abandonnée dans l'environnement subit donc un processus de fragmentation qui varie en fonction de la nature du polymère, de son âge, de sa forme et de ses caractéristiques physico-chimiques (densité, cristallinité,  $T_g$ , ...) mais également de facteurs environnementaux comme l'action du soleil, de la température, de la présence de sédiments et du mouvement des vagues.

Une des principales causes des réactions environnementales responsables de la fragmentation du plastique est le rayonnement UV produit par le soleil qui conduit à la photo-oxydation. Ce rayonnement entraîne l'oxydation de la matrice polymère causant la formation de radicaux et une rupture des liaisons qui réduit la masse molaire du polymère et par conséquent conduit à des plastiques cassants et se désintégrant<sup>12</sup>. Une autre forme d'oxydation pouvant également avoir lieu dans l'environnement et ayant pour cause l'effet du soleil est la thermo-oxydation. Alors que les conditions de température des océans réduisent ce phénomène<sup>13</sup>, ce n'est pas le cas des plastiques stagnant sur les plages. La thermo-oxydation se produit dans des matériaux plastiques soumis à de fortes températures causant l'accumulation de chaleur dans le matériau et rendant de fait le plastique fragile et sujet à la fragmentation<sup>14</sup>.

Un second processus environnemental menant à la fragmentation du plastique est la dégradation physique qui peut se dérouler aussi bien en eau douce (rivières, lacs) qu'en eau salée (mers, océans). Celle-ci résulte de l'abrasion par des sédiments ou des grains de sable, du frottement et de la turbulence causés par le roulement des vagues<sup>15</sup>. Ici aussi, la fragmentation augmente une fois que les débris plastiques atteignent la terre ferme en raison des collisions entre particules associées à des processus de transport tels que la saltation<sup>16</sup>. En outre, dégradations physique et chimique sont complémentaires puisque la perte d'intégrité structurelle causée par la dégradation chimique rend le matériau plus sensible à la fragmentation physique. De façon analogue, les processus physiques produisent des fractures et des rainures qui constituent des sites favorables aux processus d'oxydation<sup>17</sup>. Un dernier phénomène qui a un effet synergique sur la fragmentation des pièces de plastiques présentes dans l'environnement est la présence de microorganismes à la surface des matériaux. Des microorganismes présents dans les interstices du plastique peuvent en effet être responsables d'une fragilisation du matériau propice à sa fragmentation<sup>18</sup>. En plus de la fragmentation, l'altération des plastiques par les phénomènes d'oxydation et de dégradation physique entraîne une modification de la réactivité de surface du matériau. La photo-oxydation va créer des groupes contenant de l'oxygène, participant à l'augmentation de la polarité du matériau tandis que la colonisation de la surface des microplastiques par un biofilm et la présence de précipités chimiques en surface vont accroître la charge, la rugosité, la porosité et l'hydrophilie de la surface.

Le plastique rejeté dans l'environnement subit donc des phénomènes de photo-oxydation, de thermo-oxydation ainsi que de dégradation physique conduisant à rendre le matériau cassant et friable. Cela engendre la dissémination d'une quantité très importante de micro- nanoplastiques dans tous les compartiments environnementaux et les réseaux trophiques.

### 1.3. Présence dans l'environnement

#### 1.3.1. Compartiments environnementaux

La contamination de l'environnement par les déchets plastiques est une préoccupation croissante. En 2019, une équipe a mis en évidence la présence de fragments de plastique incrustés à la surface de rochers d'une île volcanique de l'Atlantique qu'ils ont nommé la *plasticrust* (*plasticrust* en anglais)<sup>19</sup>. Ces polluants sont à tel point omniprésents dans l'environnement que des chercheurs ont proposé de les utiliser comme indicateur géologique de l'ère Anthropocène<sup>20</sup>.

La présence de petits fragments de plastique en haute mer a été mise en évidence pour la première fois dans les années 1970<sup>21,22</sup>. Depuis, un regain d'intérêt scientifique pour les microplastiques au cours des deux dernières décennies a révélé que ces contaminants sont répandus et omniprésents dans

l'environnement marin<sup>23,24</sup>. Portés par les courants océaniques et les vents, les débris plastiques dérivent sur de grandes distances jusqu'à des endroits éloignés comme autour d'îles isolées dans l'océan<sup>25</sup>, dans les océans Arctique<sup>26-28</sup> et Austral<sup>29-31</sup> ou dans la profondeur des océans<sup>32</sup>.

Les études portant sur la présence de plastique dans l'environnement se sont presque entièrement concentrées sur le milieu marin. Pourtant, ces polluants ont dans la majorité des cas une origine terrestre et sont transportés par les systèmes fluviaux<sup>33</sup>. L'étude de Kay *et al.*<sup>34</sup> est l'une des premières à quantifier les microplastiques dans les bassins versants et à déterminer les sources potentielles de pollution. Bien que les usines de traitement des eaux usées soient l'une des principales sources de cette pollution, l'agriculture et les dépôts aériens de microplastiques provenant d'une autre zone en sont également des causes. Les études portant sur les rivières restent cependant limitées et beaucoup se focalisent sur l'impact des usines de traitement des eaux usées<sup>35</sup>. Dans le registre de l'eau douce, les chercheurs se sont aussi intéressés à la présence de plastiques dans les lacs. Les 5 Grands Lacs d'Amérique du Nord ont ainsi été scrutés par plusieurs équipes<sup>36-40</sup> et les résultats mettent en évidence des concentrations en plastique élevées retrouvées aussi bien dans les sédiments que dans l'eau. Les plastiques prélevés sont majoritairement des microplastiques et les concentrations les plus importantes retrouvées (32 part m<sup>-3</sup>) sont corrélées à des périodes de pluie propices au ruissellement<sup>37</sup>. Un lien de causalité relie cette pollution aux densités de population, de tourisme et d'industrie concentrées autour de ces 5 Grands Lacs.

Les plastiques sont également retrouvés dans les sols et les sédiments. Les sols agricoles, par exemple, sont parfois amendés avec les boues issues des usines de traitement des eaux usées qui contiennent une quantité importante de micro- nanoplastiques<sup>35,41</sup> ou bien avec des déchets ménagers composés principalement de plastiques qui sont broyés et mélangés à du compost organique. Dans une étude<sup>42</sup>, des chercheurs se sont intéressés à un tel terrain agricole dont le dernier amendement en déchets ménagers broyés et mélangés à du compost remonte à plus d'une décennie. Ils ont extrait des nanoplastiques d'une taille allant de 20 à 150 nm, ce qui met en évidence les phénomènes de dégradation de la matière plastique rencontrés dans l'environnement. Concernant les sédiments, des échantillons prélevés en Arctique<sup>43</sup> à une profondeur comprise entre 200 et 5 500 m renferment des concentrations en microplastiques allant de 40 à près de 6 600 part kg<sup>-1</sup>. À l'opposé du globe, en Antarctique<sup>44</sup>, dans la baie de Terra Nova, des chercheurs ont prouvé la présence de plus de 1 600 débris plastiques sur 31 échantillons de sédiments soit près de 50 morceaux de plastiques par point d'échantillonnage.

Tout comme l'eau et les sédiments des zones polaires, la banquise et les glaciers renferment également du plastique. Obbard *et al.*<sup>45</sup> ont ainsi détecté des concentrations de microplastiques dans la glace de

mer arctique supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles rapportées dans des eaux de surface hautement contaminées telles que celle du gyre du Pacifique nord. La glace semble donc être un compartiment de forte accumulation des particules de plastique<sup>46</sup>. De plus, cette glace est susceptible de dériver et donc de transporter et de disséminer le plastique qu'elle contient<sup>47</sup>. Dans un contexte de réchauffement climatique, la fonte des banquises et glaciers laisse donc présager d'un futur apport considérable de micro- nanoplastiques dans les océans.

Concernant l'atmosphère, une étude publiée en 2021 apporte les premières preuves de sa contamination par les microplastiques. Cette étude a prouvé leur présence dans l'air à plus de 2800 mètres d'altitude à l'Observatoire du Pic du Midi en France. Des taux allant de 0,09 à 0,66 part m<sup>-3</sup> d'air ont été analysés et ont mis en évidence un véritable processus de transport troposphérique de microplastiques<sup>48</sup>. Les plastiques sont donc présents dans la totalité des compartiments environnementaux ce qui est propice à leur dissémination dans les différents réseaux trophiques.

### 1.3.2. Réseaux trophiques

Un réseau trophique représente l'ensemble des interactions d'ordre alimentaire entre les êtres vivants d'un écosystème. Il devient alors évident que si un seul organisme ingère du plastique tous les autres êtres vivants du réseau trophique seront impactés. Et en effet, les microplastiques et les nanoplastiques sont considérés comme biodisponibles pour les organismes vivants<sup>49,50</sup>. Ils sont ainsi retrouvés accumulés dans le système digestif de toutes sortes d'êtres vivants, du ver de terre<sup>51</sup> à des grands mammifères comme les baleines et les ours polaires<sup>52</sup>. Plusieurs équipes de chercheurs ont montré que ces micro- nanoplastiques ingérés par les organismes vivants pourraient être associés à une malnutrition liée à un sentiment de satiété, d'une mortalité précoce et de problèmes de développement et de reproduction<sup>53,54</sup>.

En termes de réseaux trophiques marins, Gall et Thompson<sup>55</sup> ont publié une revue approfondie sur les connaissances concernant les effets des débris marins sur les organismes vivants. Ils ont répertorié 340 publications faisant référence à des contacts entre organismes et débris marins (par ingestion ou piégeage de l'organisme dans le débris par exemple). Les déchets plastiques représentaient pas moins de 92% de ces contacts. Goldstein *et al.*<sup>49</sup> se sont intéressés à des petits crustacés qui mangent planctons et œufs de poisson à la surface de la mer. Sur 385 prélèvements dans le gyre du Pacifique nord, 33% présentaient des particules de plastiques dans leur tube digestif. D'un minimum d'une particule à un maximum de trente par crustacé, la majorité du plastique ingéré était du PE, PP et PS. Les oiseaux marins sont également concernés puisqu'une nouvelle maladie a été découverte dans une population de Puffin à pieds pâles vivant sur une île entre l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Des

chercheurs ont directement relié la présence de plastique dans l'estomac de ces oiseaux à des dommages tissulaires majeurs. Bien que les estomacs contenaient également des éléments indigestes naturels comme de la pierre ponce, c'est bien le plastique qui semblait provoquer la fibrose. Les chercheurs ont ainsi proposé le nom de *plasticose* (*plasticosis* en anglais) pour désigner cette maladie<sup>56</sup>.

Les chaînes alimentaires terrestres sont également concernées<sup>57,58</sup> et une étude menée en Espagne s'est intéressée à un champ agricole pratiquant la technique du paillis plastique. Ils ont d'une part prouvé que le paillis en plastique était à l'origine de la présence de fragments de plastiques dans le sol, mais également que les moutons pâturent ensuite sur le champ en ingéraient. Alors qu'ils ont quantifié 2 000 particules de plastique par kg de sol, 1 000 particules de plastique par kg d'excrément ont été retrouvées dans les déjections des moutons<sup>59</sup>. Huerta Lwanga *et al.*<sup>51</sup> ont eux réussi à mettre en évidence le long transfert du contaminant plastique dans le milieu trophique dans un jardin traditionnel maya au Mexique. Ils ont en effet quantifié le plastique dans le sol puis dans les vers de terre, les poulets et finalement dans les gésiers des volailles destinés à la consommation humaine. Alors qu'ils ont détecté 0,9 particule de plastique par g de sol, ce taux est passé à 15 particules par g d'excrément de ver de terre, puis à 130 particules par g d'excrément de poulet et a finalement atteint le taux de 10 particules de microplastique par gésier.

Concernant les plantes, le plastique est capable de pénétrer le système végétal par les racines, les feuilles et la transpiration *via* des processus d'absorption et de translocation. Les nanoplastiques sont même suffisamment petits pour pénétrer les parois cellulaires des plantes<sup>60,61</sup>. Le plastique est donc partout dans les chaînes alimentaires : sols, plantes, crustacés, oiseaux, volailles, bétail, ... L'Homme, souvent considéré comme le dernier maillon de cette chaîne, en ingère donc quotidiennement.

Les études portant sur la détection de plastiques dans le corps humain s'accroissent avec notamment 4 études publiées en 2021 et 2022 qui ont permis de prouver leur présence dans les excréments<sup>62</sup>, le lait maternel<sup>63</sup>, le placenta<sup>64</sup> et le sang<sup>65</sup>. Dans les excréments, les chercheurs ont comparé la teneur en plastique (polytéréphtalate d'éthylène, PET) de selles d'adultes et de nourrissons pour estimer leurs expositions journalières. Ainsi pour les bébés une médiane de 36 µg de PET par g d'excrément est trouvée contre 2,6 µg de PET par g d'excrément d'adulte. Les nourrissons sont donc beaucoup plus exposés que les adultes, l'étude estimant une exposition journalière de 83 µg de plastique par kg de poids corporel pour les bébés contre 5,8 µg par kg de poids corporel pour les adultes<sup>62</sup>. Si l'utilisation de biberons en plastique réchauffés au four à micro-ondes peut être une source de relargage de microplastiques, une source inattendue se situe dans le lait maternel. En effet, une étude portant sur 34 échantillons de lait maternel a montré que 26 échantillons contenaient des microplastiques tels que du PE, PP, PVC de tailles comprises entre 2 et 12 µm. Cette étude a réalisé une analyse statistique des

données spécifiques des patientes mais aucune relation significative liée à l'usage de produits contenant des microplastiques (hygiène, aliments, boissons) n'a été démontrée<sup>63</sup>. Même le placenta humain semble en contenir. C'est en tout cas ce que révèle une étude au titre évocateur de « Plasticenta » portant sur une petite cohorte de femmes. Sur 6 placentas analysés, un total de 12 fragments de microplastiques de tailles comprises entre 5 et 10  $\mu\text{m}$  ont été retrouvés dans 4 placentas<sup>64</sup>. Concernant le sang, une étude a apporté une première quantification de la concentration massique en plastiques de 22 volontaires sains<sup>65</sup>. Au moins 5 polymères ont été détectés portant la concentration à  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ces études montrent ainsi que l'omniprésence des plastiques rend l'exposition humaine inévitable.

Enfin, en plus d'intégrer les écosystèmes existants *via* les réseaux trophiques, le plastique a aussi créé son propre écosystème : la Plastisphère<sup>66</sup>. Ce terme désigne la communauté de microorganismes qui se développe sur les débris de plastique flottant et qui du fait de la mobilité des débris peut conduire au transport d'espèces non indigènes au-delà de leur aire de répartition historique<sup>67-71</sup>. Plasticroûte, Plasticose, Plasticenta, Plastisphère, ... le plastique s'immisce aussi bien dans l'environnement que dans le lexique et il est urgent de comprendre son comportement. Afin d'y parvenir, des études en laboratoire sont régulièrement menées par des équipes de chercheurs. Cependant, pour que ces études soient utiles à la communauté scientifique et transposables aux micro-nanoplastiques environnementaux, il est préférable de choisir des concentrations environnementales réalistes. Mais déterminer des concentrations réalistes ou bien simplement trouver des valeurs de référence dans la bibliographie n'est pas facile du fait d'une grande diversité de données allant de relevés *in situ* à des estimations obtenues par modélisation.

### 1.3.3. Concentrations environnementales

Le plastique est donc retrouvé dans tous les compartiments environnementaux ainsi que dans les écosystèmes. Pour étudier en laboratoire le comportement de ces polluants dans différentes matrices, les chercheurs ont besoin de connaître les concentrations environnementales afin de réaliser des études réalistes. Cependant, il n'est pas facile de déterminer ces concentrations environnementales étant donné que ces valeurs sont très variables et dépendent du milieu ainsi que des sources de production / déversement à proximité du milieu. Par exemple, l'étude qui a montré des concentrations en microplastique de l'ordre de 0,09 à 0,6  $\text{part m}^{-3}$  dans l'air environnant le Pic du Midi à plus de 2800 mètres d'altitude ne peut pas être étendue à toute l'atmosphère de la planète. En effet cette valeur fluctuera avec l'activité humaine (densité de population, d'industrie, en somme la densité de production de déchets plastiques aux alentours). En plus de cela, il est nécessaire de prendre en compte

les circulations atmosphériques, les vents, les phénomènes climatiques, ... Il est donc difficile d'établir des valeurs de concentrations environnementales. De plus, il existe des freins analytiques à la détermination de ces concentrations environnementales en raison de concentrations faibles ou d'interférences importantes dues à la matrice dans laquelle l'échantillon est étudié.

Face à ces deux freins, de plus en plus de chercheurs proposent des estimations de flux grâce à de la modélisation numérique. Après avoir listé des publications utilisant des concentrations en microplastiques de 2 à 7 ordres de grandeur supérieures à celles rapportées par les études sur le terrain, Lenz *et al.*<sup>53</sup> ont réalisé une régression par loi de puissance afin d'estimer les concentrations environnementales en microplastiques dans l'océan. Leur régression établit ainsi la concentration en microplastiques de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre dans l'océan à 0,20  $\text{part m}^{-3}$  et de 6 800  $\text{part m}^{-3}$  pour des microplastiques 50 fois plus petit (10  $\mu\text{m}$ ). Leur régression s'établit également jusqu'à des diamètres de 50 nm, correspondant alors aux nanoplastiques. Pour les nanoplastiques de 50 nm, ils estiment la concentration en particules à près de  $10^{10}$   $\text{part m}^{-3}$ . Reynaud *et al.*<sup>72</sup> ont récemment repris ces données pour proposer une concentration massique de nanoplastiques dans l'océan. En utilisant le volume d'eau cumulé dans les océans ( $1\,400\,10^6$   $\text{km}^3$ ) ainsi qu'une estimation des déchets accumulés dans l'environnement (200  $10^6$  tonnes, selon Jambeck *et al.*<sup>23</sup>), ils proposent l'intervalle de 0,14 à 1,4  $\text{ng L}^{-1}$  de nanoplastiques dans les océans. Concernant les sols agricoles, une récente étude de Kedzierski *et al.*<sup>73</sup> a permis d'y estimer la concentration en microplastiques. À partir des données issues de 43 articles, ils ont pu évaluer la concentration massique en microplastiques dans les sols agricoles à une gamme allant de 1 à 5,6  $\text{mg m}^{-3}$ . Cependant les auteurs soulignent la difficulté de réaliser un calcul très précis avec notamment un manque de données concernant certaines utilisations des sols ou certains pays.

Finalement, il est donc difficile de proposer des concentrations environnementales de référence aux chercheurs étudiant ces polluants en laboratoire étant donné la disparité des données. Pour exemple, Koelmans *et al.*<sup>74</sup> ont révélé dans leur revue des concentrations en microplastiques dans les eaux douces et eaux potables qui s'étendent sur 10 ordres de grandeur (de  $10^{-2}$  à  $10^8$   $\text{part m}^{-3}$ ). Ainsi, lors de la réalisation d'études en laboratoire portant sur la pollution environnementale aux micro-nanoplastiques, il est important de cibler dès le début des travaux le compartiment environnemental qui sera l'objet de l'étude afin de choisir une valeur réaliste de concentration en polluant déterminée dans ce compartiment.

Le plastique est donc répandu dans tous les compartiments environnementaux et réseaux trophiques où il subit des dégradations conduisant à la réduction de ses dimensions et à l'obtention de particules de tailles inférieures, les micro- nanoplastiques. Cependant, ce plastique n'est pas uniquement

constitué d'une matrice polymère, des additifs étant très souvent ajoutés à la matrice afin de moduler les propriétés du matériau final. Ces additifs contenus dans les débris plastiques environnementaux représentent une source de toxicité supplémentaire qu'il est important d'étudier.

#### 1.4. Plastique et métaux

Lors de la formulation de matériaux plastiques, les industriels ont à leur disposition une longue liste d'additifs pouvant être ajoutés à la matrice polymère afin de moduler les propriétés du matériau final. Ces additifs peuvent être de nature organique, métallique ou organo-métallique. Les additifs métalliques peuvent être de différentes formes (poudre, oxyde, stéarate, sulfate, carbonate, ...) et sont ajoutés à la matrice polymère afin de, par exemple, rendre le matériau final plus résistant aux dégradations causées par les rayons UV, la chaleur et les organismes vivants, minimiser les risques de propagation d'incendies, ou encore pour colorer ou conférer des propriétés antidérapantes au produit final. Le Tableau 1. 1 (données issues de la publication de Campanale *et al.*<sup>75</sup>) regroupe les effets de différents métaux sur leur association à une matrice polymère.

Tableau 1. 1 : Liste des propriétés des principaux additifs métalliques retrouvés dans les plastiques (issue de la référence : <sup>75</sup>)

| Métal          | Utilisation   |
|----------------|---|
| Aluminium (Al) | Stabilisateur, pigment, retardateur de flamme                         |
| Titane (Ti)    | Stabilisateur UV, pigment   |
| Chrome (Cr)    | Pigment   |
| Manganèse (Mn) | Pigment   |
| Cobalt (Co)    | Pigment   |
| Cuivre (Cu)    | Biocide   |
| Zinc (Zn)      | Stabilisateur thermique, retardateur de flamme, antidérapant, pigment |
| Arsenic (As)   | Biocide   |
| Brome (Br)     | Retardateur de flamme   |
| Cadmium (Cd)   | Stabilisateur thermique et UV, pigment                                |
| Etain (Sn)     | Stabilisateur UV, biocide   |
| Antimoine (Sb) | Retardateur de flamme, biocide  |
| Barium (Ba)    | Stabilisateur UV, pigment   |
| Mercure (Hg)   | Biocide   |
| Plomb (Pb)     | Stabilisateur thermique et UV, pigment                                |

Bien que certains de ces additifs soient maintenant interdits par la législation européenne, il est possible d'en retrouver dans des plastiques fabriqués avant leur interdiction. Et comme un plastique se dégrade lentement dans l'environnement, il est ainsi possible de retrouver des micro- nanoplastiques environnementaux contenant des additifs interdits depuis des années. Les plastiques contiennent donc bien souvent des métaux depuis leurs fabrications, mais les sources de métaux dans les micro- nanoplastiques ne s'arrêtent pas là. Dans une étude publiée dès 2012, Holmes *et al.*<sup>76</sup> ont analysé les concentrations en métal (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd et Pb) dans des échantillons de microplastiques (granulés) échantillonnés sur des plages du sud de l'Angleterre. Les concentrations en métaux retrouvées dans leurs échantillons pouvaient être égales ou supérieures aux concentrations retrouvées dans des sédiments prélevés sur le même site d'échantillonnage notamment en ce qui concerne le zinc. Il s'agit d'un premier résultat surprenant d'autant plus que la surface géométrique des granulés de PE est de l'ordre du  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , soit bien moins élevée que la surface spécifique des sédiments estuariens qui est de l'ordre du  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ . Ils ont alors mené des études visant à quantifier les capacités d'adsorption des sept métaux cités plus haut par des échantillons de microplastiques environnementaux et neufs. Leurs études ont été réalisées sur des granulés de microplastiques plongés dans une eau de mer filtrée puis adjuvée de métal (concentration en microplastique =  $10 \text{ g L}^{-1}$  ; concentration en métal =  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Cette concentration en métal n'est pas représentative de la concentration environnementale moyenne dans l'eau de mer mais est, en revanche, en adéquation avec les concentrations retrouvées dans les zones environnementales les plus contaminées (eaux côtières, microcouche à la surface de la mer, ...). Les résultats montrent des capacités d'adsorption plus élevées pour les microplastiques environnementaux que pour les microplastiques neufs. Par exemple dans cette étude le coefficient de partage à l'équilibre  $K_D$  pour le plomb est de  $149 \text{ mL g}^{-1}$  pour les échantillons environnementaux, contre  $0,245 \text{ mL g}^{-1}$  pour les échantillons neufs.

L'adsorption de métaux par les microplastiques est donc un fait depuis plus de 10 ans, mais qu'en est-il pour les nanoplastiques ? C'est ce que Dravanche *et al.*<sup>77</sup> ont récemment étudié avec le plomb. À partir d'échantillons environnementaux de microplastiques échantillonnés dans une zone exposée au gyre du Pacifique nord ils ont produit, par sonication, des nanoplastiques chargés négativement qu'ils ont ensuite exposés dans deux solutions contenant du plomb à des concentrations différentes. Les résultats obtenus qui dépendent de la concentration d'exposition montrent une adsorption très rapide avec de 78 à 97% du plomb présent dans le milieu d'étude adsorbé en 2 minutes. Ces données ont pu être linéarisées par un modèle de pseudo-second ordre dans lequel le facteur limitant la vitesse est l'adsorption de surface. La constante de vitesse d'adsorption du plomb par les nanoplastiques calculée est ainsi de 240 ou  $72 \text{ mg mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , suivant la concentration d'exposition (respectivement 2 et  $6 \text{ mg g}^{-1}$ ). La concentration maximale en plomb adsorbée par les nanoplastiques est de 1,89 ou  $5,44 \text{ mg g}^{-1}$ .

(concentration d'exposition respectivement de 2 et 6 mg g<sup>-1</sup>). Les chercheurs ont également analysé ces données en utilisant un modèle de diffusion intraparticulaire et ont finalement montré que l'adsorption du plomb par les nanoplastiques est la conséquence de deux phénomènes. Le premier est l'adsorption de surface avec une vitesse assez rapide puis la diffusion intraparticulaire, qui est plus lente et progressive, prend le dessus. La saturation progressive de la surface par adsorption semble être confirmée grâce à leur expérience qui est réalisée à deux concentrations en plomb différentes : à concentration en nanoplastiques constante c'est à la plus faible concentration en plomb que le taux de plomb adsorbé est le plus élevé.

Les nanoplastiques disposent donc également d'une forte capacité d'adsorption des polluants métalliques puisque Davranche *et al.*<sup>77</sup> ont calculé une constante d'adsorption de Freundlich qui s'élève à 460 pour les nanoplastiques et qui est à comparer à la constante d'adsorption de Freundlich issue des travaux de Holmes *et al.*<sup>76</sup> portant sur les microplastiques qui est de 0,21 (recalculée par Davranche *et al.*<sup>77</sup>).

Cette première partie a porté sur la découverte d'un matériau considéré comme révolutionnaire au XX<sup>ème</sup> siècle et qui représente maintenant une véritable source de pollution des écosystèmes. Le plastique semble en effet s'être immiscé dans tous les compartiments environnementaux et réseaux trophiques du globe. À cause de phénomènes de dégradations conséquents à son séjour dans l'environnement les dimensions d'une pièce de plastique ne vont cesser de diminuer, produisant ainsi des quantités très importantes de microplastiques et de nanoplastiques. Ces particules ne sont pas inertes face aux organismes vivants qu'elles rencontrent. Par exemple, les plus grosses de ces particules peuvent représenter un véritable piège pour les animaux en entravant leur mobilité et les plus petites peuvent être ingérées par toutes sortes d'organismes vivants. Concernant l'ingestion, des études corrélient la présence de particules de plastiques dans les estomacs des organismes à des problèmes de développement et de reproduction et à une mortalité précoce. Par ailleurs, ces particules de plastiques peuvent également contenir des métaux en leurs seins ce qui aura sans doute pour conséquence d'augmenter la toxicité de ces particules. Face à tous ces constats, il est important que des études soient réalisées afin de cartographier ce polluant dans l'environnement, de comprendre son comportement et de connaître sa toxicité. Pour cela, les chercheurs peuvent s'appuyer sur des méthodes analytiques variées et complémentaires qui font l'objet de la partie suivante.

## 2. Les méthodes analytiques pour l'analyse du plastique

Les méthodes analytiques disponibles pour l'analyse des microplastiques sont nombreuses et complémentaires. Pour les nanoplastiques, le choix est plus restreint mais des développements méthodologiques sont régulièrement publiés. Ainsi, depuis le début de ces travaux de thèse démarrés en 2020, le nombre de publications dans des journaux scientifiques a suivi une croissance exponentielle, notamment pour la publication d'articles (Figure 1. 1A). La Figure 1. 1 a été réalisée le 13 juin 2023 sur Web of Science en recherchant, dans le champ titre d'article, les mots clés suivants : ((nanoplastic\* OR microplastic\*) AND (analytical\* OR characteri\* OR identification\* OR detection\* OR (analysis AND method\*))) sur la période allant de 1970 à 2022. La Figure 1. 1A présente l'évolution du nombre de publications (articles et revues) entre 2012 et 2022 (seuls 6 articles ayant été publiés entre 1970 et 2011, ces données n'ont pas été intégrées à ce graphique) et la Figure 1. 1B présente le pourcentage de publications (articles et revues) publié entre 1970 et 2022 en fonction du domaine d'étude (des publications peuvent correspondre à plusieurs domaines d'étude).

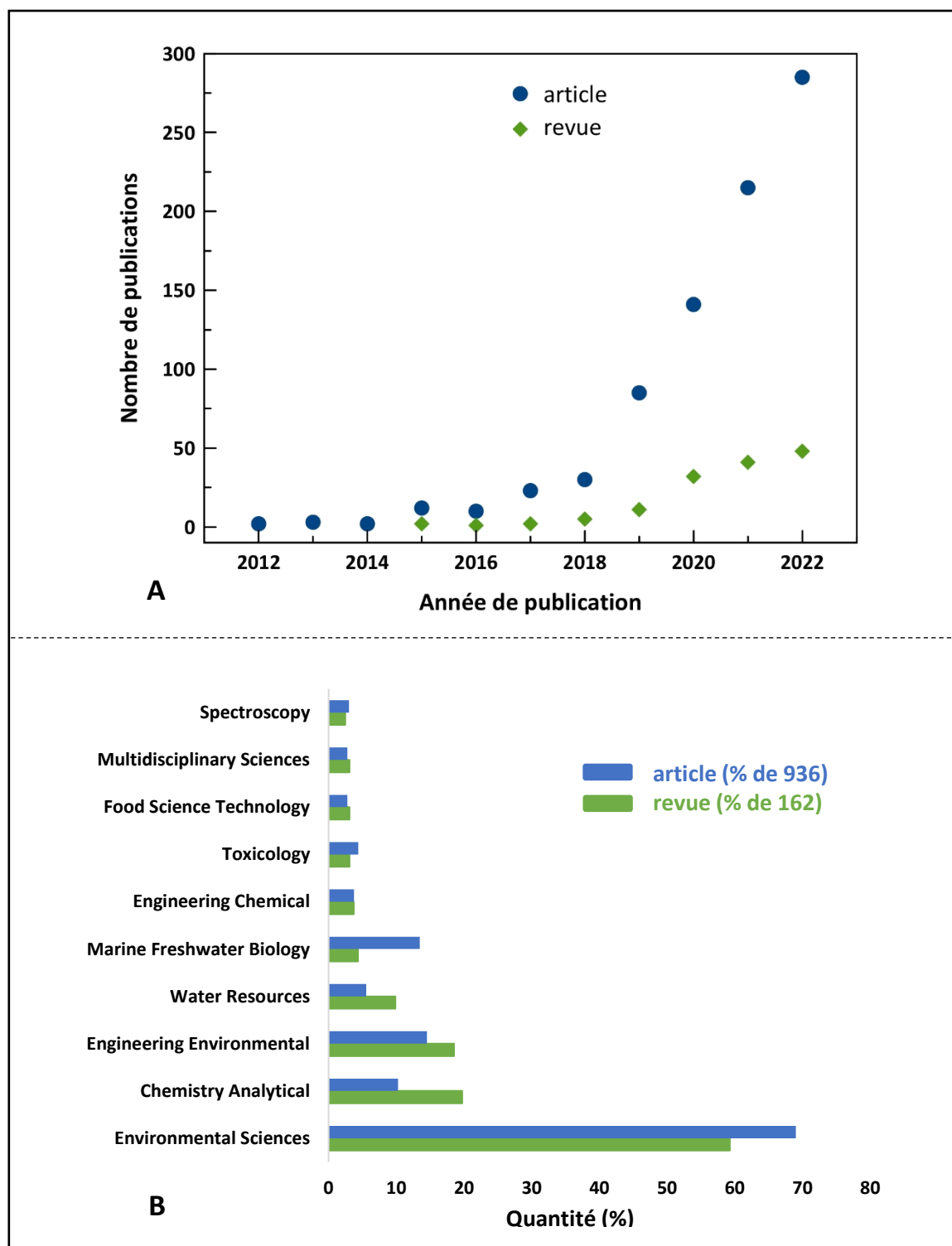


Figure 1. 1 : A) Nombre d'articles (ronds bleus) et de revues (losanges verts) publiés entre 2012 et 2022 et B) pourcentage d'articles (bleu) et de revues (vert) publié entre 1970 et 2022 en fonction du domaine d'étude (des publications peuvent correspondre à plusieurs domaines d'étude). Ces données ont été récupérées sur Web of Science le 13 juin 2023 avec les mots clés suivants : « ((nanoplastic\* OR microplastic\*) AND (analytical\* OR characteri\* OR identification\* OR detection\* OR (analysis AND method\*))) »

Depuis 1970, 936 articles scientifiques ont été publiés traitant de la caractérisation de micro-nanoplastiques sur la base de cette recherche. Il est à noter qu'entre 1970 et 2012 seuls 6 articles ont été publiés. La grande majorité de ces publications date donc d'une dizaine d'années. Une observation également importante à souligner est que seulement 8 articles sur ces 936 ont été publiés dans le journal *Analytical Chemistry*, considéré comme le journal de référence pour le développement méthodologique. Ainsi, à part ces 8 articles qui semblent décrire et proposer des innovations et des développements méthodologiques, les 928 autres s'appuient sur des techniques analytiques déjà développées et éprouvées. Concernant les revues, c'est à partir de 2012 que la première est publiée, sur la base de cette recherche. Là encore, c'est donc au cours de ces dix dernières années que ces 162 revues ont été rédigées et proposées à la communauté scientifique. Parmi ces 162 revues, plus de 20% proposent une thématique sur la chimie analytique. La masse d'informations traitant des méthodes analytiques pour l'étude des micro- nanoplastiques est ainsi très importante et c'est pourquoi cette partie présente un résumé des techniques les plus couramment utilisées en les classant suivant la nature des caractéristiques recherchées.

### 2.1. Caractérisations de la morphologie, de la surface et des dimensions

Pour visualiser la morphologie de micro- nanoplastiques, les chercheurs peuvent s'appuyer sur la microscopie. Cette technique permet la visualisation d'un échantillon sec et donc la caractérisation de sa morphologie. Les 3 techniques couramment utilisées dans le contexte des micro- nanoplastiques sont la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à force atomique (AFM). Les résolutions de ces trois techniques, allant du millimètre au nanomètre, sont reportées dans le Tableau 1. 2 ci-dessous.

Tableau 1. 2 : Résolution des principales techniques de microscopie pour l'analyse des micro- nanoplastiques

| Technique                    | LOD inférieure | LOD supérieure | MP           | NP               |
|------------------------------|----------------|----------------|--------------|------------------|
| Microscopie optique          | 500 nm         | 30 mm          | Oui          | 500 nm – 1000 nm |
| Microscopie électronique     | 1 nm           | 50 µm          | 1 µm – 50 µm | Oui              |
| Microscopie à force atomique | 1 nm           | 50 µm          | 1 µm – 50 µm | Oui              |

Avec sa résolution couvrant la gamme de 500 nm à 30 mm, la microscopie optique permet de visualiser un échantillon et de classer les microplastiques suivant leurs formes et leurs couleurs<sup>28</sup>. Pour une observation plus résolue de l'échantillon, la microscopie électronique, à balayage (SEM) ou à transmission (TEM) est plus adaptée. Alors que la SEM permet l'imagerie de la surface de l'échantillon, avec la TEM, grâce à la transmission de son faisceau d'électrons à travers l'échantillon, il est possible

d'obtenir différents contrastes suivant la profondeur d'analyse et ainsi visualiser l'intérieur des particules. La SEM peut par exemple permettre l'obtention d'image de la surface d'un microplastique permettant la visualisation de fissures<sup>78</sup> ou d'un biofilm<sup>79</sup> qui est reconnaissable grâce à la présence de microorganismes caractéristiques (bactéries, diatomées, ...). La TEM est capable de caractériser la présence de particules métalliques au sein de nanoplastiques modèles (Chapitre 4 des travaux de thèse d'Antoine Aynard<sup>80</sup>) par exemple, mais est également utilisée pour visualiser la morphologie de nanoplastiques environnementaux<sup>11</sup>. Enfin, la microscopie à force atomique enregistre le profil en hauteur d'un échantillon permettant la visualisation de la topographie de sa surface avec une meilleure résolution qu'en SEM. Cette technique est par exemple utilisée par Pessoni *et al.*<sup>81</sup> pour caractériser la rugosité de surface de leurs nanoplastiques modèles après une première observation en SEM. La fine résolution de leurs analyses en AFM permet ainsi de visualiser les surfaces lisses puis de plus en plus rugueuses de leurs nanoplastiques modèles.

Ces techniques de microscopie, en plus de caractériser physiquement un échantillon, peuvent également tendre vers la quantification grâce à des méthodes reposant sur l'utilisation de marqueurs fluorescents combinés à des logiciels de comptage<sup>82</sup>. Dans leur étude, Prata *et al.*<sup>82</sup>, après avoir comparé 8 solutions de colorants fluorescents, ont sélectionné le rouge du Nil comme étant le plus approprié pour la visualisation des polymères synthétiques. Les longueurs d'ondes d'excitation qu'ils ont retenues sont 254 et 470 nm, la première évitant les interférences avec la matière organique mais limitant le nombre de polymères visualisables et la deuxième permettant la visualisation d'un plus grand nombre de polymères mais nécessitant une étape de digestion de la matière organique. Finalement, grâce au développement d'un programme sur ImageJ (MP-VAT), ils ont pu rendre les caractérisations de la forme et de la taille de leurs microplastiques environnementaux automatiques.

L'analyse de la morphologie, de la taille et de la surface de tous les micro- nanoplastiques est donc possible par microscopie. Cette technique peut nécessiter une étape de préparation de l'échantillon afin de retirer biofilms et particules inorganiques afin de s'assurer que l'observateur analyse bien le micro- nanoplastique lui-même. Pour cette technique, il n'y a pas à proprement parler de limites de détection inférieure et supérieure en termes de concentration. Il doit évidemment y avoir suffisamment de particules à observer (étape de pré-concentration possible) et les particules ne doivent pas, dans la mesure du possible, se chevaucher pour réaliser un comptage effectif.

Alors que la microscopie permet la caractérisation en taille d'échantillons secs de micro-nanoplastiques, il existe également des techniques permettant cette caractérisation sur des échantillons en phase dispersée. Pour la caractérisation des tailles et de la polydispersité d'échantillons colloïdaux de nanoplastiques (1 – 1000 nm), il existe la diffusion dynamique de la lumière (DLS). Dans

cette technique, un laser traverse une dispersion colloïdale et un photodétecteur enregistre les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée. Ces fluctuations d'intensité, qui sont causées par le mouvement brownien des particules présentes dans le colloïde, sont ensuite traitées numériquement pour générer une fonction d'autocorrélation. Enfin, plusieurs algorithmes mathématiques peuvent être appliqués à cette fonction afin de déterminer la distribution en taille de l'échantillon ainsi que la polydispersité. Les principaux algorithmes sont le « cumulants » et le « Sparse Bayesian Learning (SBL) ». Le premier prend pour hypothèse la présence d'une seule population dans l'échantillon avec une distribution gaussienne et est donc adapté pour des échantillons monodisperses. Le second prend pour hypothèse la présence de plusieurs populations et est donc capable d'analyser des échantillons polydisperses. C'est cette technique qui a été utilisée pour mettre en évidence pour la première fois la présence de nanoplastiques dans les eaux de surface du gyre de l'Atlantique nord. Dans leurs travaux, Ter Halle *et al.*<sup>83</sup> ont déterminé les limites de détection de leur instrument de DLS à l'aide de standards de latex de PS commerciaux. La détection était ainsi possible sur la gamme  $0,02 \text{ mg L}^{-1} - 200 \text{ mg L}^{-1}$ . La caractérisation en taille était quant à elle possible sur une gamme plus réduite de concentration, de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  à  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Cette différence entre LOD et LOQ s'explique par une intensité de la lumière trop faible ou trop forte pour caractériser les tailles. Pour se situer dans ces gammes de détection ou de quantification, les chercheurs peuvent s'appuyer soit sur une étape de dilution, soit sur une étape de concentration. Pour l'analyse d'échantillons environnementaux, Ter Halle *et al.*<sup>83</sup> ont fait appel à une étape de pré-concentration afin d'y détecter la présence de nanoplastiques. Après avoir filtré leurs échantillons pour retirer les particules supérieures à  $1,2 \mu\text{m}$ , l'analyse par DLS n'a pas permis de détecter la présence de colloïdes. Mais, après concentration de leurs échantillons d'un facteur 200 par ultracentrifugation, l'équipe a confirmé la présence de plusieurs populations polydisperses de nanoplastiques dans plusieurs de leurs échantillons. Cette étape de concentration par ultracentrifugation à 10 kDa a d'ailleurs permis d'éliminer la matière organique dissoute inférieure à ce seuil.

La DLS est donc adaptée à la caractérisation en tailles d'échantillons colloïdaux de nanoplastiques. Bien que sa gamme d'analyse en termes de concentration soit restreinte, les chercheurs ont la possibilité de diluer ou de concentrer leurs échantillons pour garantir une analyse fiable. Enfin, il est à noter que la DLS détecte la présence de toutes les nanoparticules présentes dans le colloïde. Ainsi, si l'échantillon contient des particules (in)organiques, la distribution obtenue tiendra compte de toutes les nanoparticules présentes, pas uniquement les nanoplastiques. De plus, la présence de grosses nanoparticules a tendance à cacher la présence de nanoparticules plus petites qui sont alors sous-représentées dans la valeur moyenne de l'analyse. Pour des échantillons présentant des populations polydisperses, l'analyse du suivi des nanoparticules (NTA) est une bonne alternative à la DLS car moins

perturbée par la présence de grosses particules. Ce montage permet de déterminer les coefficients de diffusion et la taille des nanoparticules en suivant et en analysant individuellement et simultanément les trajectoires décrites par les nanoparticules dans une dispersion<sup>84</sup>.

Enfin, la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS), est une autre technique de diffusion de la lumière qui permet cette fois la mesure de la charge de surface des particules représentée par la valeur du potentiel zêta. Les nanoplastiques environnementaux présentent des surfaces oxydées et donc des changements de charges de surface une fois dans l'environnement. La mesure du potentiel zêta peut donc être un outil intéressant pour caractériser l'état d'altération des nanoplastiques<sup>85</sup>.

La microscopie, la DLS, la NTA et l'ELS représentent les principales techniques existantes pour la caractérisation de la morphologie, des dimensions et de la surface des micro- nanoplastiques. Pour l'identification chimique et la quantification massique, les chercheurs peuvent s'appuyer sur d'autres techniques dont les principales sont présentées dans la partie suivante.

## 2.2. Identification chimique et quantification

Pour l'identification chimique et la quantification de micro- nanoplastiques, les chercheurs ont recours à deux grandes familles de méthodes analytiques : les spectroscopies infrarouge et Raman ainsi que la pyrolyse ou la thermo-extraction désorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (Pyr-GC-MS et TED-GC-MS, respectivement).

Les spectroscopies d'absorption FTIR (*Fourier Transformation InfraRed* en anglais) et Raman reposent sur l'interaction du rayonnement électromagnétique avec les vibrations moléculaires et permettent de déterminer la nature chimique du plastique. Couplées avec un microscope, ces techniques peuvent également quantifier les micro- nanoplastiques et déterminer leurs morphologies. Il s'agit donc de deux techniques largement employées dans cette problématique (près de deux publications sur cinq citées dans la partie « 1.3. Présence dans l'environnement » y ont recours). La différence principale entre ces deux techniques réside dans la résolution de l'analyse : la FTIR est utilisable pour des microplastiques de dimensions allant jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  tandis que la Raman descend jusqu'à 300 nm, voire 50 nm pour la technique dite à pinces optiques<sup>86</sup> (*Raman Tweezers* (RT) en anglais) récemment développée. Ainsi, grâce à des développements analytiques récents, des déclinaisons de ces techniques permettent maintenant l'étude et la caractérisation des nanoplastiques jusqu'à 50 nm.

Sans module complémentaire, ces deux types de spectroscopie sont donc plutôt adaptés aux microplastiques. L'ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance* en anglais) permet l'analyse de microplastiques jusqu'à des tailles de 200  $\mu\text{m}$  grâce à un cristal en contact avec l'échantillon. Pour des observations plus

résolues, les chercheurs peuvent s'appuyer sur la microscopie couplée à la FTIR<sup>87</sup> ou à la spectroscopie Raman<sup>63</sup> ( $\mu$ -FTIR ou  $\mu$ -Raman, respectivement) qui permet alors d'atteindre des tailles de 10 – 20  $\mu\text{m}$ . Alors que pour l'ATR-FTIR il est nécessaire d'analyser les particules une par une, la technique couplée à la microscopie ( $\mu$ -FTIR) permet d'analyser des filtres entiers contenant plusieurs populations de microplastiques. Par ailleurs, comme pour la microscopie, l'analyse peut être informatisée par des logiciels de comptage<sup>88</sup>.

Ces deux types de spectroscopie couplés à un microscope permettent également l'acquisition automatisée d'images d'un échantillon. Afin de savoir quelle technique choisir en fonction de l'analyte, K  ppler *et al.*<sup>89</sup> ont publié une étude dans laquelle ils ont comparé leurs performances. Après avoir échantillonné des microplastiques sur une plage en Allemagne, les chercheurs ont purifié, filtré et disposé leurs échantillons sur des filtres de silice. Ces filtres ont ensuite été analysés par les deux techniques spectroscopiques ( $\mu$ -FTIR et  $\mu$ -Raman) sur une zone de 1000 x 1000  $\mu\text{m}$ . Du fait des paramètres nécessaires pour une telle analyse, la  $\mu$ -Raman a nécessité 38h de fonctionnement quand la  $\mu$ -FTIR a nécessité seulement 20 min. Cependant, en comparant avec l'analyse de  $\mu$ -Raman, la  $\mu$ -FTIR a montré des taux de sous-estimation du nombre de particules allant jusqu'à 35%, notamment pour les microplastiques inférieurs à 20  $\mu\text{m}$ . Les auteurs de cette étude préconisent ainsi d'utiliser la FTIR pour les microplastiques supérieurs à 50  $\mu\text{m}$  et de privilégier la spectroscopie Raman pour les nano-microplastiques de tailles inférieures. D'ailleurs, Gillibert *et al.*<sup>86</sup> ont récemment réalisé une avancée technique pour l'analyse des micro- nanoplastiques dans l'eau de mer par spectroscopie Raman avec un couplage utilisant des pinces optiques. Ces pinces Raman permettent le piégeage optique puis l'identification chimique de fragments de plastiques couvrant la gamme de taille allant de 50 nm à 20  $\mu\text{m}$ . Cette technique permet de discriminer sans ambiguïté la matière plastique de la matière organique et des sédiments minéraux et également de caractériser tailles et formes de ces micro- nanoplastiques. La spectroscopie s'ouvre donc à l'analyse des nanoplastiques à mesure que des méthodes sont développées et, aujourd'hui, il est ainsi possible d'analyser des nanoplastiques jusqu'à 50 nm avec ces techniques.

Concernant la préparation de l'analyse il est à noter qu'il est important de passer par une étape de préparation de l'échantillon quelle que soit la technique envisagée. Pour des analyses en ATR-FTIR, l'échantillon doit être purifié de ses particules inorganiques qui pourraient abîmer le cristal. L'eau, qui présente des bandes d'absorption très fortes et très larges, susceptibles de chevaucher la signature spectrale du microplastique, doit également être retirée de l'échantillon. La sensibilité à l'eau que présente cette technique est d'ailleurs considérée comme la principale limite à cette méthode.    l'inverse, la spectroscopie Raman est insensible à l'eau et permet donc l'étude de micro- nanoplastiques en matrice environnementale (  chantillon mouillé et présence d'organismes vivants). Cependant, bien

que l'analyse Raman soit possible en présence d'organismes vivants, cette technique est très sensible à la présence de fluorophores naturels (matières organiques, minéraux argileux, ...). Enfin, il est important de noter que ces deux techniques ne reposent pas sur la même réponse de l'échantillon à un rayonnement électromagnétique. Alors que la spectroscopie IR repose sur l'existence de moments dipolaires à l'intérieur de la molécule, la spectroscopie Raman repose sur la polarisabilité des liaisons. Un même groupe fonctionnel répondra donc différemment que ce soit en spectroscopie IR ou en Raman. Par exemple, la réponse vibrationnelle à la présence de liaisons covalentes polaires sera plus prononcée en IR tandis que les liaisons non polaires, aromatiques et les liaisons impliquant des atomes lourds répondront plus intensément en Raman. En combinant ces deux techniques, il est donc possible d'obtenir des informations complémentaires sur la matrice polymère et les additifs organiques et métalliques la constituant<sup>90</sup>.

Jusqu'à présent, les principales méthodes permettant de caractériser des micro- nanoplastiques en termes de morphologies, de dimensions et d'états de surface, d'identifier leurs compositions chimiques et de les quantifier en termes de nombre de particules ont été présentées. Afin de déterminer une concentration massique dans un échantillon environnemental, il est courant de se tourner vers des méthodes destructrices que sont la pyrolyse ou la thermo-extraction désorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (Pyr-GC-MS et TED-GC-MS, respectivement).

La Pyr-GC-MS et la TED-GC-MS sont donc deux techniques analytiques permettant la quantification massique de micro- nanoplastiques dans un échantillon ainsi que l'identification chimique. Concernant, la Pyr-GC-MS, elle repose sur la décomposition thermique de l'échantillon sous atmosphère inerte puis sur la séparation sur colonne chromatographique des produits de décomposition et enfin sur leurs analyses *via* un détecteur sélectif de masses. Les polymères sont alors identifiés par leurs produits de pyrolyse typiques en utilisant des bases de données spectrales. Pour la TED-GC-MS, la pyrolyse est associée à un module d'analyse thermogravimétrique (TGA) et à un adsorbeur en phase solide. Après adsorption des produits de décomposition de l'échantillon par pyrolyse, l'adsorbeur est introduit dans une unité de désorption thermique. Les produits de décomposition sont alors désorbés puis analysés par GC-MS. La différence principale entre ces deux techniques est la quantité d'échantillons analysable : alors que la Pyr-GC-MS est limitée à l'analyse de quelques centaines de microgrammes, la TED-GC-MS permet l'analyse de quantité beaucoup plus importante, allant jusqu'à 100 mg<sup>91</sup>. Cette quantité analysable plus importante permet de garantir des analyses représentatives de l'échantillon et d'éviter une sélection préalable (pouvant induire un biais ou une contamination).

Concernant les microplastiques, Hermabessiere *et al.*<sup>92</sup> ont développé et proposé une méthode d'analyse permettant la quantification de polymères courants avec des limites de détection inférieures à 1 µg. Précisément, ils ont obtenu des LOD comprises entre 0,003 et 0,12 µg pour le PA-6 (Nylon 6), le PC, le PE, le PET, le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le PP et le PS et de 0,6 µg pour le PVC. La masse d'échantillons analysée n'est cependant pas reportée dans cette étude, les auteurs reportant seulement des analyses sur des particules d'environ 200 µm introduites dans les creusets d'analyses. Pour des échantillons environnementaux, ces limites de détection restent assez hautes. Par rapport aux données de Kedzierski *et al.*<sup>73</sup> estimant la concentration en microplastiques dans les sols à 1 mg m<sup>-3</sup> (limite basse), et en fixant la LOD à 0,1 µg, il faudrait concentrer pas moins de 130 g de sol dans un creuset d'analyse pour dépasser les limites de détection. Une étape de concentration peut donc être envisagée, mais quoi qu'il en soit, il est à noter que la Pyr-GC-MS est sensible à la présence d'interférents dans la matrice. Il est ainsi nécessaire d'avoir recours à une étape de préparation de l'échantillon pour retirer matières organiques et particules inorganiques. Dans leur étude, Fries *et al.*<sup>93</sup> ont par exemple recours à une séparation par densité dans une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl) afin d'extraire les microplastiques de leurs échantillons de sédiments. Fischer *et al.*<sup>94</sup> proposent eux un protocole de préparation d'échantillons biologiques basé sur des étapes de digestions enzymatique et chimique. Les étapes de préparation de l'échantillon pouvant être sources de contamination ou de pertes d'analyte, il est possible de se tourner vers le TED-GC-MS pour éviter cette étape.

En effet, dans cette technique ce sont les gaz de décomposition de l'échantillon, adsorbés sur une colonne qui sont analysés rendant possible l'identification de microplastiques en matrices environnementales complexes. C'est ce qu'ont montré Dümichen *et al.*<sup>95</sup> dans leur étude. À partir d'une matrice biologique et d'une matrice environnementale adjuvées de microplastiques de PE (taille = 1 mm) sans aucun traitement de l'échantillon (séparation, purification, ...), ils ont été capables d'identifier le PE dans les échantillons. Sur une masse d'échantillons de 4 mg, ils ont ainsi mesuré des concentrations en PE de l'ordre de 5% massique avec des taux de recouvrement compris entre 65 et 98% suivant la matrice étudiée. Cette étude se concentre sur le PE mais semble prometteuse puisque des premiers résultats sur le PP et le PS montrent les mêmes tendances. Le recours à la TED-GC-MS sur des échantillons environnementaux complexes permettraient ainsi de s'affranchir des étapes de préparation de l'échantillon. Cependant, pour l'étude d'échantillons environnementaux, une étape de pré-concentration est nécessaire pour dépasser les LOD de cette technique.

Concernant les nanoplastiques, le recours à ces deux méthodes destructrices est moins courant, mais quelques études rapportent l'usage de la TED-GC-MS<sup>42,83</sup>. Les principaux freins à l'analyse des nanoplastiques sont, d'une part, que la masse d'un nanoplastique est très basse et, d'autre part, que

leurs concentrations environnementales sont très faibles. Pour l'analyse de nanoplastiques, tout se joue finalement sur les étapes de préparation et de concentration de l'échantillon. Ainsi, pour identifier et quantifier la présence de nanoplastiques dans des sols, Wahl *et al.*<sup>42</sup> ont recours à une première étape de séparation par fractionnement par couplage flux – force à flux croisés (AF4) qui en plus de séparer, permet de caractériser en taille. Pour concentrer leurs échantillons, ils ont introduit plusieurs volumes d'échantillons dans leurs creusets d'analyse en laissant évaporer la phase liquide entre chaque ajout.

La Pyr-GC-MS et la TED-GC-MS sont donc des méthodes permettant la quantification de micro-nanoplastiques ainsi que l'identification chimique. Alors que la Pyr-GC-MS permet l'analyse de quelques centaines de microgrammes et est sensible aux interférences, la TED-GC-MS rend possible l'analyse de plusieurs dizaines de milligrammes d'échantillons dans une matrice environnementale. Quant aux nanoplastiques, des études proposent des protocoles pour leurs analyses par TED-GC-MS nécessitant des étapes de séparation et de concentration de l'échantillon. Cependant, il existe pour ces deux techniques, une limite haute en termes de dimensions d'échantillons analysables. En effet, l'échantillon doit être suffisamment petit pour pénétrer dans les creusets d'analyse. Concernant la représentativité des analyses, ces méthodes sont donc plutôt adaptées à la fraction inférieure des microplastiques. Hermabessiere *et al.*<sup>92</sup> ont comparé les performances de la Pyr-GC-MS avec celles de la  $\mu$ -Raman. En termes d'identification, les performances sont globalement égales, mais la Pyr-GC-MS se dégage sur 2 aspects : elle s'est avérée capable d'analyser des microplastiques colorés et d'identifier la présence de co-polymères, ce qui est impossible par  $\mu$ -Raman.

Jusqu'à présent les méthodes analytiques permettant de caractériser les micro- nanoplastiques en forme et en taille, de les identifier et de les quantifier en nombre et en masse ont été présentées. Le choix de la méthode analytique dépendra alors des propriétés recherchées, des dimensions des échantillons ainsi que de la matrice de l'échantillon. Dans le cadre de ces travaux de thèse, un dernier volet présentant les principales méthodes analytiques permettant de quantifier la présence de métaux dans des échantillons de micro- nanoplastiques est nécessaire et est l'objet de la partie suivante.

### 2.3. Analyse des métaux dans les plastiques

Comme présenté dans la partie 1.4 Plastique et métaux, la majorité des plastiques contiennent des métaux provenant de deux sources distinctes. La première source provient de l'étape de fabrication des pièces de plastiques au cours de laquelle des métaux sont très souvent ajoutés à la matrice polymère pour modifier les propriétés finales du matériau. La seconde source concerne les plastiques environnementaux et est la conséquence du séjour de ces polluants dans un environnement chargé en

métaux. Des études ont en effet montré que les micro- nanoplastiques sont capables de sorber des métaux présents dans leurs milieux. Pour étudier et quantifier ces métaux dans des micro- nanoplastiques, les chercheurs ont donc besoin de méthodes analytiques adaptées à ces analytes et ces matrices. Plusieurs méthodes sont ainsi retrouvées permettant de quantifier des métaux ioniques ou particulaires et des matrices liquides ou solides. L'analyse des métaux peut également être réalisée sur l'entièreté de l'échantillon (analyse « totale »), sur une certaine profondeur (de l'ordre du micromètre) ou bien en extrême surface (de l'ordre du nanomètre).

La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) permet l'analyse totale des métaux dans des échantillons de microplastiques. En termes de limite de détection des métaux, les ICP-MS les plus performants offrent des limites de détection atteignant le  $\text{ng L}^{-1}$  permettant la détection des métaux, même à l'état d'ultra-trace. L'analyse de nanoplastiques est également possible bien que peu d'étude en fasse état. Dans cette technique, l'analyte doit être sous forme liquide. Dans cette optique, les chercheurs ont deux possibilités, i) minéraliser l'entièreté de l'échantillon de micro- nanoplastiques et analyser à la fois la matrice et les métaux et ii) désorber les métaux présent dans la matrice de l'échantillon et analyser alors uniquement les métaux.

Pour ce qui est de la minéralisation de l'entièreté de l'échantillon, plusieurs protocoles existent dans la littérature. Acosta-Coley *et al.*<sup>96</sup> proposent ainsi de minéraliser des échantillons de microplastiques échantillonnés sur des plages à l'aide d'une solution concentrée d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et d'acide fluorhydrique (HF) puis à l'aide d'une solution concentrée de  $\text{HNO}_3$  et d'acide chlorhydrique (HCl). Afin de rendre la minéralisation plus rapide, il est également possible d'utiliser le rayonnement micro-ondes avec des appareils dédiés de digestion micro-ondes<sup>97</sup>. La désorption de l'analyte dans l'optique de son analyse par ICP-MS se fait par exposition de l'échantillon de microplastiques à une ou plusieurs solutions d'acide. Turner *et Holmes*<sup>76</sup>, dans leurs travaux visant à étudier la sorption de métaux dans des granulés de microplastiques, ont ainsi désorbé les métaux adsorbés par exposition de leurs échantillons à un bain de HCl pendant 24 heures. Une autre méthode combinant désorption et minéralisation a été proposée par Catrouillet *et al.*<sup>98</sup>. Ils ont développé une méthode basée sur trois protocoles de lixiviation des métaux. Le premier lavage consiste en un rinçage à l'eau désionisée afin de récupérer les métaux présents dans le biofilm, les minéraux précipités à la surface et la matière organique. Le second lavage est un rinçage à l'acide nitrique diluée pour retirer les métaux adsorbés en surface. La dernière étape est la minéralisation de l'échantillon pour récupérer tous les métaux restants. Ces deux techniques de préparation de l'échantillon présentent des avantages et des inconvénients. La minéralisation de l'entièreté de l'échantillon permet de s'assurer de l'analyse de tous les métaux présents dans l'échantillon mais ne fait pas de distinction entre les métaux présents en tant qu'additifs des métaux sorbés dans l'environnement. Au contraire, la désorption des métaux adsorbés

permet l'analyse des métaux sorbés uniquement mais il y a un risque important que tout l'analyte ne soit pas désorbé, ce qui conduirait à une sous-estimation de la concentration en métal. Le choix de la méthode d'extraction de l'analyte pour l'analyse ICP-MS doit donc être fait en fonction des objectifs de l'étude et le taux de recouvrement doit être déterminé avec précision.

Pour l'analyse des métaux en surface d'échantillons solides, il existe l'ablation laser couplée ICP-MS (LA-ICP-MS). Cette technique est adaptée aux microplastiques, mais les nanoplastiques, dont les dimensions sont très faibles, ne peuvent être analysés par cette technique. Dans ce couplage, un laser ablate la surface de l'échantillon et la poudre ablatée est envoyée, au moyen d'un flux gazeux, vers un ICP-MS qui analyse en direct les éléments d'intérêts. L'analyse peut être réalisée sur plusieurs centaines de micromètre de profondeur par passage successif du laser sur un même endroit. Le signal est alors enregistré pour chaque profondeur ablatée et il est possible d'observer l'évolution de la concentration en métal à travers le matériau. El Hadri *et al.*<sup>99</sup> ont ainsi utilisé cette technique pour caractériser la présence de métaux dans des échantillons de microplastiques échantillonnés sur des plages. Ces microplastiques ont été directement analysés par LA-ICP-MS et les signaux des différents métaux (Fe, Cu, Zn, As, Cd, Sn, Sb, Pb et U) ont été enregistrés. Les profils de concentration obtenus ont permis de distinguer les métaux présents en tant qu'additifs des métaux sorbés dans l'environnement. En effet, alors que le signal d'un métal additif est constant dans la profondeur du microplastique, le signal d'un métal sorbé diminue avec la profondeur d'ablation. Il s'agit donc là d'une avancée intéressante permettant d'identifier les métaux additifs des métaux sorbés. Identifier mais pas quantifier car telle quelle, la quantification n'est pas encore possible. Pour la rendre possible, il serait intéressant d'étudier la possibilité de calibrer le signal analytique grâce à des matériaux de référence.

Une autre technique permettant l'analyse des métaux en surface d'échantillons solides est la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS). Cette technique, très souvent couplée à un SEM afin de visualiser la surface de l'échantillon, utilise les rayons X caractéristiques générés par l'échantillon irradié par un faisceau d'électrons pour l'identification des éléments chimiques. Comme pour la LA-ICP-MS, cette technique n'est pas adaptée pour l'analyse de nanoplastiques et la quantification n'est possible que si le signal analytique est calibré. Par rapport à la LA-ICP-MS, la SEM-EDS permet d'analyser un endroit précis de la surface d'un échantillon grâce à la visualisation de sa surface par microscopie. Dans leur étude, Wang *et al.*<sup>97</sup> ont utilisé cette technique afin d'identifier la composition élémentaire de leurs échantillons. Après avoir identifié les métaux présents, ils ont pu analyser leurs échantillons en ICP-MS en enregistrant le signal des métaux dont la présence a été déterminée par SEM-EDS. La SEM-EDS peut ainsi être utilisée en amont d'analyse ICP-MS dans le but de préparer les analyses d'ICP-MS.

Pour l'analyse de l'extrême surface (< 10 nm) de micro- nanoplastiques, deux technologies sont disponibles : la spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (TOF-SIMS) et la spectroscopie de photoélectrons à rayons X (XPS). Le TOF-SIMS mesure le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) des ions émis après pulvérisation de la surface de l'échantillon par un faisceau d'ions primaires tandis que l'XPS mesure les photoélectrons émis lors de l'irradiation de la surface de l'échantillon par des rayons X. La différence principale entre ces deux techniques réside donc dans l'information obtenue : le TOF-SIMS permet de mettre en évidence la présence de fragments moléculaires chargés alors que l'XPS permet de déterminer la nature des liaisons chimiques. Par ailleurs, les analyses en TOF-SIMS ont lieu sur 1 à 2 nm de profondeur tandis qu'en XPS, l'analyse a lieu sur 10 nm de profondeur. Ces deux techniques ont été utilisées par Aynard *et al.*<sup>100</sup> pour étudier la sorption du cuivre sur des modèles de nanoplastiques fonctionnalisés. Alors que l'XPS a permis de caractériser l'oxydation de la surface des modèles et la présence de cuivre, le TOF-SIMS a permis de mettre en évidence la présence de fragments moléculaires de cuivre oxydé. Cette observation confirme de fait l'existence d'interactions directes du cuivre avec les groupes carboxyliques à la surface des nanoplastiques, observation qui n'aurait pas pu être réalisée en utilisant uniquement l'XPS.

Une dernière technique permettant l'analyse de métaux dans des plastiques est l'ICP-MS en mode particule unique (SP-ICP-MS). Cette méthode permet l'analyse de métaux sous forme particulaire dans des nanoplastiques. Barber *et al.*<sup>101</sup> ont ainsi développé une méthode facilitant la caractérisation de nanoparticules métalliques dans des nanoplastiques modèles. Dans leur protocole, les chercheurs utilisent le fractionnement par couplage flux – force à flux croisés (AF4) pour préparer leurs échantillons. Les analyses en SP-ICP-MS ont ensuite permis de déterminer la masse ( $0,75 \text{ fg} = 0,75 \cdot 10^{-15} \text{ g}$ ) et le diamètre équivalent (40 nm) des nanoparticules métalliques contenues dans les nanoplastiques. Une autre étude de Jiménez-Lamana *et al.*<sup>102</sup> utilise également la SP-ICP-MS pour l'étude de nanoplastiques sur lesquels des nanoparticules métalliques sont adsorbées. La méthode qu'ils ont développée présente une limite de quantification en nombre estimée à  $8,4 \cdot 10^5 \text{ part L}^{-1}$  et une calibration linéaire jusqu'à  $3,5 \cdot 10^8 \text{ part L}^{-1}$ . Par rapport aux concentrations environnementales proposées par Lenz *et al.*<sup>53</sup>, cette gamme de linéarité permet l'analyse d'échantillons de nanoplastiques prélevés dans l'océan (pour des nanoplastiques de 50 nm, la concentration dans l'océan, selon leur modélisation, est de  $10 \cdot 10^6 \text{ part L}^{-1}$ ). La SP-ICP-MS est donc une technique adaptée pour l'analyse de nanoparticules métalliques au sein de nanoplastiques. Par rapport à l'ICP-MS qui pourrait également permettre cette analyse, la SP-ICP-MS permet l'analyse de concentrations en nanoplastiques très faibles. Il est à noter que cette méthode n'est pas adaptée pour la quantification des métaux solubilisés, ils doivent même être retirés de l'échantillon (par centrifugation par exemple) pour ne pas augmenter le bruit de fond du signal et donc diminuer la sensibilité de l'instrument aux nanoparticules métalliques.

Cette technique pourrait donc être utilisée pour identifier et quantifier la présence de nanoparticules métalliques à la surface ou dans des nanoplastiques environnementaux, mais jusqu'à présent, peu d'études utilisent cette technique sur des échantillons environnementaux. En effet, cette technique est le plus souvent employée dans un contexte de développement et d'utilisation de modèles de nanoplastiques marqués (voir partie 3. Modèles de micro- nanoplastique).

Les méthodes analytiques dédiées à l'analyse des métaux dans des micro- nanoplastiques sont donc nombreuses et complémentaires. Elles permettent d'identifier voire de quantifier des métaux ioniques ou des nanoparticules métalliques et de déterminer l'origine des métaux (additifs ou sorbés) dans des échantillons liquides ou solides. L'analyse peut se faire sur la totalité de l'échantillon, à sa surface ou son extrême surface. Ces techniques sont donc globalement bien optimisées bien que des améliorations puissent encore être apportées. Par exemple, pouvoir calibrer le signal analytique enregistré en LA-ICP-MS permettrait de quantifier les métaux additifs et sorbés dans des échantillons de microplastiques environnementaux.

Les deux premières parties de ce chapitre ont permis de rendre compte de la dissémination du plastique dans l'environnement et les réseaux trophiques ainsi que des réactions de fragmentation qu'il y subit. Les principales méthodes analytiques adaptées à l'analyse de ces polluants ont été présentées. Un large panel de techniques permet ainsi de caractériser la morphologie, la surface et les dimensions des micro- nanoplastiques mais également d'identifier leurs compositions chimiques et de les quantifier en nombre et en masse. Plusieurs techniques existent également pour caractériser les métaux présents dans ces polluants. Ces techniques sont un atout indispensable aux chercheurs pour pouvoir étudier et caractériser le comportement de ces particules. Il reste tout de même des freins en termes de tailles, de concentrations détectables et d'interférences avec les matrices dans lesquelles les échantillons sont présents. Ainsi, afin de faciliter l'étude de ces polluants, les chercheurs développent et proposent des modèles de micro- nanoplastiques pour l'étude expérimentale. Ces modèles reprennent les caractéristiques des micro- nanoplastiques environnementaux à différents degrés (taille, polymorphisme, oxydation du surface, ...) et de plus en plus de ces modèles contiennent un traceur. Ces traceurs qui peuvent être de différentes natures permettent de faciliter le suivi et la quantification du modèle de micro- nanoplastique en s'affranchissant des limites de détection en termes de tailles, des problèmes d'interférences avec la matrice d'étude et en diminuant les limites de détection en termes de concentration.

### 3. Modèles de micro- nanoplastiques

Afin de mieux appréhender la pollution globale en micro- nanoplastiques rencontrée dans la plupart des compartiments environnementaux et des réseaux trophiques, de nombreuses études portant sur ce polluant sont réalisées en laboratoire. Il est en effet primordial de comprendre leurs comportements en termes de transports et d'interactions. Pour ce faire, les chercheurs ont recours à l'utilisation de modèles de micro- nanoplastiques qu'eux-mêmes développent. Dans le but de représenter le plus fidèlement possible les micro- nanoplastiques environnementaux, ces modèles doivent leur correspondre notamment en termes de taille, de morphologie, de dispersité et d'état de surface. Des modèles répondant à ces critères sont ainsi retrouvés dans la littérature et récemment, les chercheurs ont commencé à intégrer un traceur dans ces modèles. En effet, du fait de l'existence de freins analytiques pour l'étude de ces particules (dimensions, concentrations, matrices, ...), ajouter un traceur de nature chimique différente d'un polymère dans les modèles permet de visualiser plus facilement les modèles. Par exemple, un traceur fluorescent permettra de visualiser un modèle sous microscopie plus facilement et des traceurs isotopique et métallique permettront de quantifier un modèle à une concentration beaucoup plus faible que pour un modèle non marqué.

#### 3.1. Modèles non marqués

Avant de développer eux-mêmes leurs modèles, les chercheurs se sont intéressés à la possibilité de détourner de leurs usages des particules micrométriques vendues dans le commerce. Ces particules sont des standards produits par les industriels qui sont calibrés en taille ou présentant des charges de surface anionique, cationique ou neutre permettant, par exemple, la calibration d'instruments analytiques. Ces standards ont d'abord été monopolisés par les biologistes qui ont été les premiers à publier des résultats portant sur la toxicité de ces particules<sup>103,104</sup>. Mais des études mettent en garde contre la composition de ces standards et viennent mettre à mal le détournement de leurs usages pour la réalisation d'études de toxicité notamment. Ces standards peuvent en effet contenir des additifs toxiques apportant ainsi un biais aux études produites par les chercheurs. Par exemple, Pikuda *et al.*<sup>105</sup> ont relié la toxicité de particules micrométriques commerciales, utilisées par les chercheurs dans des études d'(éco)-toxicologie pour représenter des nanoplastiques, uniquement à la présence de conservateur (azide de sodium). En effet, après purification des particules commerciales et donc retrait de l'additif, aucune toxicité sur les organismes aquatiques n'a été observée. Un autre exemple est l'étude de Sussarellu *et al.*<sup>106</sup> qui a relevé la présence de perturbateurs endocriniens dans des particules micrométriques commerciales utilisées par les chercheurs pour représenter des microplastiques.

Réaliser des études en laboratoire avec des particules micrométriques commerciales présente donc des inconvénients et n'est pas à privilégier. Des chercheurs ont alors développé des modèles de nanoplastiques produits en laboratoire. Ces modèles sont majoritairement sphériques ce qui permet un meilleur contrôle en termes de tailles et de charges de surface. Mais des protocoles pour obtenir des modèles polymorphiques et polydisperses sont également proposés en ayant notamment recours à des étapes de broyage. En termes de modèles de nanoplastiques sphériques obtenus par synthèse, les travaux de *Pessoni et al.*<sup>81</sup> peuvent être cités. Dans leurs travaux, ils ont développé un protocole de synthèse de nanoplastiques de PS chargés à la surface par des fonctions carboxyliques permettant ainsi de mimer l'état d'oxydation de surface des nanoplastiques environnementaux. Cette polymérisation en émulsion est réalisée sans tensio-actif et les modèles obtenus, exempts de tout additif, sont sphériques et monodisperses et la charge de surface est modulable. Pour l'obtention de modèles de nanoplastiques polymorphiques, *El Hadri et al.*<sup>107</sup> ont développé un protocole de broyage à partir de microplastiques environnementaux et commerciaux. Dans leur méthode, une première étape de broyage a été réalisée à l'aide d'un broyeur à lames dans le but d'obtenir une poudre. Cette poudre a ensuite été broyée à l'aide d'un broyeur à billes au moyen de plusieurs cycles afin de ne pas trop chauffer le matériau (10 cycles de 3 minutes à une vitesse de 450 rpm). Les nanoplastiques modèles obtenus sont très polydisperses avec des charges de surface négatives et présentent des caractéristiques très proches de celles des colloïdes naturels.

Ces deux exemples de travaux permettent donc de produire des nanoplastiques modèles monodisperses ou polydisperses, sphériques ou polymorphiques et présentant une surface oxydée représentatives des nanoplastiques environnementaux. Cependant, ces modèles ne contiennent pas de traceurs et donc leurs identifications à des concentrations environnementales réalistes et en matrices environnementales (eau, sol, organisme vivant, ...) nécessitent des étapes de séparation et de concentration avant leurs analyses. Pour s'affranchir de ces freins analytiques, des modèles de micro-nanoplastiques incluant un traceur ont été développés.

### 3.2. Modèles marqués

#### 3.2.1. Marquages fluorescent et isotopique

Pour la synthèse de micro- nanoplastiques fluorescents quelques protocoles sont proposés. Par exemple, *Facchetti et al.*<sup>108</sup> ont établi un protocole permettant la synthèse de microplastiques de PVC marqués avec un complexe de platine (Pt) fluorescent excitable à deux longueurs d'onde distinctes. Pour cela, ils ont solubilisé du PVC commercial dans du tétrahydrofurane (THF) puis ajouté un complexe fluorescent de Pt et finalement précipité le mélange dans une solution de NaCl. Ils ont alors obtenu des

microplastiques de PVC d'une taille moyenne de 100  $\mu\text{m}$ . Le premier intérêt de ce complexe au Pt est qu'il présente deux énergies d'excitation, pouvant être utiles pour réduire les interférences causées par la fluorescence de la matrice. Le second intérêt est que ce marqueur constitue en fait un traceur à la fois fluorescent et métallique, permettant l'utilisation des techniques analytiques dédiées à l'analyse des métaux (voir 2.3. Analyse des métaux dans les plastiques et 3.2.2. Marquage métallique). Pour les nanoplastiques fluorescents modèles, Akbulut *et al.*<sup>109</sup> proposent un protocole basé sur la nanopréciipitation permettant de produire des nanoparticules de 30 à 800 nm dans lesquelles le fluorophore est encapsulé dans le polymère. La nanopréciipitation repose sur la solubilisation d'un fluorophore et d'un copolymère dans un solvant organique (THF) puis la rapide injection de cette solution dans un non-solvant (eau). Ce protocole présente des avantages, comme la possibilité de moduler la longueur d'onde d'excitation, la fonctionnalité de surface et la taille de ces modèles ainsi que l'absence de phénomènes de photoblanchiment (affaiblissement de l'intensité de fluorescence au cours du temps). Cependant, ce protocole n'a pas été établi dans un contexte de pollution plastique (mais dans un contexte d'administration ciblée de médicaments) et le protocole doit donc être adapté aux polymères constituant les plastiques les plus courants.

Le recours au marquage fluorescent est donc une technique adaptée pour l'identification et la quantification de micro- nanoplastiques modèles. La quantification est cependant réalisable uniquement en nombre de particules. Pour une concentration déterminée en masse d'autres méthodes de marquage sont adaptées comme le marquage isotopique.

Le marquage isotopique de modèles de micro- nanoplastiques repose essentiellement sur l'élément carbone. Des chercheurs ont ainsi développé des méthodes de marquage avec le radioisotope  $^{14}\text{C}$  ou l'isotope stable  $^{13}\text{C}$ . En terme de radioisotope, Al-Sid-Cheikh *et al.*<sup>110</sup> ont proposé un protocole pour la synthèse en une seule étape de nanoparticules de PS marquées au  $^{14}\text{C}$  de différentes tailles (24 et 248 nm), qui peuvent être détectées et quantifiées par autoradiographie. Cette méthode a permis la quantification des nanoplastiques modèles en matrice complexe (coquilles Saint-Jacques) et à une concentration inférieure à 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Tian *et al.*<sup>111</sup> ont également développé un protocole de synthèse de nanoplastiques de PS marqués au  $^{14}\text{C}$ . À partir du monomère styrène marqué au  $^{14}\text{C}$ , ils ont synthétisé des nanoparticules de PS sphériques d'une taille moyenne de 230 nm qu'ils ont utilisées pour étudier la photo-oxydation des nanoplastiques dans l'eau à partir de la mesure de la radioactivité des échantillons. Toutefois la technique de radiomarquage présente de sérieux inconvénients, tels que la réglementation stricte et restrictive en matière de sécurité et de manipulation de matériaux radioactifs ainsi que la nécessité de dédier exclusivement l'instrument analytique à l'analyse de ces échantillons radioactifs.

Pour outrepasser ces restrictions importantes, le marquage au  $^{13}\text{C}$  a été développé comme alternative. Les monomères ou précurseurs marqués au  $^{13}\text{C}$  sont facilement disponibles chez les fournisseurs et le recours à des polymères marqués au  $^{13}\text{C}$  pour l'étude expérimentale a été bien éprouvé dans le domaine des biopolymères naturels<sup>112</sup>. Ainsi, pour étudier et caractériser la dégradation d'un polymère biodégradable dans un sol, Zumstein *et al.*<sup>113</sup> ont synthétisé des films de polymères marqués au  $^{13}\text{C}$ . Ils ont alors pu quantifier la dégradation de ces modèles marqués dans un sol. Bien que ces films de 7 mm de longueur soient en dehors de la définition d'un microplastique, il serait sans doute possible d'utiliser des supports pour le dépôt de films plus petits. L'étude de la gamme haute des microplastiques serait alors envisageable par cette technique. Le recours au marquage isotopique en est ainsi encore à ses débuts, puisque peu de protocoles de synthèse de modèles marqués sont proposés dans la littérature. Le recours aux radioisotopes semble plus développé mais la présence de radioactivité dans les échantillons limite fortement son usage. L'utilisation d'un isotope stable s'affranchit de ces risques, mais il manque des données en termes de limites de détection. Il semble en revanche s'affranchir d'éventuels problèmes d'interférences, cependant, des études sont encore nécessaires pour le confirmer.

A l'inverse, le recours au marquage métallique pour le développement de modèles de micro-nanoplastiques est plus répandu et une dizaine de publications proposent ainsi des protocoles. Cet engouement s'explique par des techniques analytiques dédiées à l'analyse des métaux très performantes, des interférences avec les matrices moindres ainsi que des limites de détection suffisamment basses pour permettre l'analyse à des concentrations environnementales.

### 3.2.2. Marquage métallique

Les pionniers en termes de développement de modèles de nanoplastiques marqués métalliquement sont sans doute Mitrano *et al.* qui, en 2019, ont proposé un protocole de polymérisation en émulsion en deux étapes pour la synthèse de nanoplastiques contenant en leur cœur des atomes de palladium (Pd) piégés chimiquement<sup>41</sup>. La première étape de leur protocole repose sur la polymérisation d'acrylonitrile initiée par un amorceur contenant du Pd permettant l'obtention de nanoparticules sphériques de polyacrylonitrile (PAN) marquées. La seconde étape est la synthèse d'une coquille enveloppant les nanoparticules de PAN par copolymérisation de styrène/divinylbenzène. Cette coquille peut être modifiée morphologiquement (en modifiant les conditions expérimentales, des surfaces lisses ou rugueuses peuvent être obtenues) et chimiquement (en utilisant d'autres monomères que le styrène). Leur méthode permet ainsi l'obtention de nanoplastiques de PS de tailles comprises entre 150 et 200 nm marqués au Pd. Leur protocole en deux étapes permet de s'assurer que le métal restera

bien confiné dans le plastique : d'une part le Pd est lié chimiquement au polymère et d'autre part, le noyau PAN-Pd est encapsulé par une écorce de polymère. D'ailleurs, cette encapsulation permet également de s'assurer que le métal ne sera jamais en interaction avec le milieu d'étude, rendant l'utilisation de ces modèles en étude (éco)-toxicologique possible. De plus, il est à noter que le recours à un métal rare comme le Pd permet de limiter le risque d'interférences avec les matrices environnementale et biologique. Les limites de détection de cette méthode, dont l'analyse est réalisée par ICP-MS, sont de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , valeur que les auteurs estiment à environ  $9,8 \cdot 10^8$  part  $\text{L}^{-1}$ . Bien que cette concentration soit supérieure à la concentration en nanoplastiques dans les océans estimée par Lenz *et al.*<sup>53</sup>, cette valeur peut être retrouvée dans des matrices où les concentrations sont plus élevées, comme dans les boues des usines de traitement des eaux usées.

Le travail de Denise Mitrano et de ses équipes ne s'arrêtent pas là puisqu'ils ont également développé un modèle de microplastiques de PET type fibres marqués à l'indium (In)<sup>114</sup>. Leur protocole repose sur l'extrusion d'un mélange de PET et d'un sel d'In (1% w/w) qui permet l'obtention de fibres de longueur moyenne de 500  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre moyen de 30  $\mu\text{m}$ . Le PET utilisé par les chercheurs dans cette étude est un PET commercial et leur extrudeuse est également comparable aux extrudeuses industrielles. Le recours à cette technique leur permet ainsi l'obtention de modèles de microplastiques marqués à l'In avec une teneur de 0,2% en masse. Concentration qui est d'ailleurs suffisamment basse pour ne pas modifier significativement la densité des modèles de PET. De plus, leur étude portant sur la lixiviation du marqueur métallique rapporte un taux de lixiviation inférieur à 0,1% au bout de deux mois. À la différence des nanoplastiques marqués au Pd, ces modèles sont minéralisés avant analyse ICP-MS, ce qui ajoute une étape pouvant être source de contamination. D'autre part, les auteurs ont atteint des limites de détection en nombre de fibre de l'ordre de  $3,6 \cdot 10^4$  part  $\text{L}^{-1}$ . Il est difficile de comparer cette valeur à des concentrations environnementales étant donné qu'il n'existe pas de données. La synthèse de ces modèles a en tout cas permis d'étudier le comportement de fibres plastiques dans les usines de traitement des eaux usées.

Pour l'obtention de modèles de PET plus petits et de formes polymorphiques, un protocole en deux étapes a été développé par Gao *et al.*<sup>115</sup>. Des feuilles de PET (provenant de bouteilles en plastique) ont d'abord été coupées puis broyées en dispersion pour finalement être séparées dans le but d'obtenir trois populations de modèles : des microplastiques (2,5  $\mu\text{m}$ ) et des nanoplastiques (900 nm, 200 nm). Le marquage métallique a été réalisé au cours d'une deuxième étape dans laquelle une solution d'iridium (Ir) a été préparée dans du THF puis mélangée avec les dispersions aqueuses des modèles de micro- nanoplastiques. Après exposition, les modèles ont été purifiés. L'étude portant sur la désorption du marqueur montre des taux de lixiviation de 3 à 5% après 3 jours d'exposition. La synthèse de ces modèles a permis à cette équipe d'étudier la dissémination de nanoplastiques dans le corps de souris

par administration intraveineuse ainsi que le comportement des micro- nanoplastiques dans des sédiments. Il est à noter que dans ce protocole aussi, une étape préalable de minéralisation est nécessaire avant analyse par ICP-MS. D'autre part, cette étude ne précise pas les limites de détection en termes de concentration en micro- nanoplastiques. Finalement, l'emploi de ces modèles dans des études (éco)-toxicologiques doit être réalisé prudemment étant donné des taux de lixiviation de l'Ir significatifs couplés au risque de présence de résidus de THF si la purification des modèles n'a pas été rigoureusement réalisée.

Dans le champ des modèles de nanoplastiques de PS, un protocole ambitieux de marquage avec un complexe de lanthanide est proposé par Luo *et al.*<sup>116</sup>. Il s'agit en fait à la fois d'un marquage métallique et d'un marquage fluorescent étant donné que ce complexe métallique présente la capacité de fluorescence. Pour le marquage, les chercheurs ont fait gonfler des nanoplastiques (PS) commerciaux dans une solution de méthanol contenant le complexe d'euporium (Eu) conduisant au marquage des modèles par la technique de gonflement – diffusion. Le principal risque de cette méthode réside dans la possibilité de désorption du marqueur. Cependant, les chercheurs ont étudié ce risque et n'ont pas relevé de désorption significative du marqueur. Ces nanoplastiques modèles, d'un diamètre moyen de 200 nm, ont ensuite été utilisés pour quantifier leurs absorptions dans des plantes (laitue et blé). À l'aide des techniques de la microscopie en fluorescence et de la spectrométrie de masse, les chercheurs ont ainsi pu suivre le transport et quantifier l'accumulation de ces polluants dans les différents organes des plantes. Le marquage avec des complexes de lanthanide semble ainsi constituer une stratégie adaptée pour élucider les interactions entre les nanoplastiques et les plantes.

Enfin, une dernière approche à explorer dans l'obtention de modèles de micro- nanoplastiques marqués métalliquement est le recours aux nanoparticules métalliques. Rauschendorfer *et al.*<sup>117</sup> reportent un protocole de synthèse de nanoplastiques (PS et PMMA) contenant des nanoparticules d'or (Au), de platine (Pt) ou de palladium (Pd). Leur méthode repose sur une première synthèse en émulsion d'un copolymère PS/poly(2-vinylpyridine) (P2VP) en présence de stabilisant et de tensio-actifs qui est ensuite recouvert d'une couche de PS ou de PMMA par polymérisation en émulsion ensemencée réalisée également en présence de tensio-actifs. Ces particules sont ensuite exposées à un sel d'or, de platine ou de palladium. Étant donné que le cœur des particules composé de PS-P2VP permet la stabilisation des ions métalliques, les métaux vont préférentiellement pénétrer au cœur des particules. Ces métaux sont ensuite réduits par photo-réduction dans une chambre à rayonnement ultra-violet. Ce protocole conduit à la synthèse de nanoplastiques marqués modèles de diamètres compris entre 300 et 500 nm qui ont été utilisés pour étudier les interactions avec des sédiments. Deux observations peuvent être réalisées sur ce protocole. Ces nanoplastiques modèles marqués sont synthétisés en présence de tensio-actifs, 10% massique étant même présent dans la couronne de PS

ou de PMMA, or comme présenté plus tôt dans cette partie, la présence de tensio-actifs peut avoir une incidence sur le comportement et la toxicité des modèles. La deuxième remarque est que l'éventuelle présence de nanoparticules métalliques en surface des modèles (dans la couronne) n'a pas été vérifiée, en étude d'(éco)-toxicité, du métal pourrait de fait entrer en contact avec le milieu d'étude. Pour la synthèse de modèles de nanoplastiques type PE et PVC marqués avec des nanoparticules d'or, une méthode est proposée par Cassano *et al.*<sup>118</sup>. La synthèse consiste en un protocole d'émulsion huile dans eau conduisant à la synthèse d'une émulsion de nanoplastiques modèles marqués de tailles comprises entre 50 et 350 nm. Pour étudier ces modèles en matrice biologique (souris et intestin humain), les chercheurs se sont tournés vers l'ICP-MS en mode cellule unique (SC-ICP-MS). Cette technique est comparable à la SP-ICP-MS, si ce n'est qu'elle permet l'analyse de la teneur en métaux intracellulaires des cellules et microorganismes. Dans leur étude, ils ont pu analyser leur modèles à des concentrations allant jusqu'à 1 ng L<sup>-1</sup>, ce qui fait de cette méthode un outil adapté pour l'étude de nanoplastiques modèles à des concentrations environnementales.

Il existe donc dans la littérature plusieurs protocoles permettant l'élaboration de modèles de micro-nanoplastiques marqués métalliquement reposant sur des synthèses par polymérisation, sur de l'extrusion, sur du gonflement – diffusion ou de la précipitation. Le Tableau 1. 3 ci-dessous présente un récapitulatif des modèles présentés dans cette partie ainsi que les matrices dans lesquelles ces modèles ont été testés.

Tableau 1. 3 : Caractéristiques des principaux modèles de micro-nanoplastiques marqués métalliquement et matrices dans lesquelles ils ont été utilisés

| Métal           | Polymère | Mode de synthèse   | Taille                    | MP ou NP | Méthode analytique               | Limite de détection                      | Matrice  | Référence |
|-----------------|----------|--|---------------------------|----------|----------------------------------|--|--|-----------|
| Pd              | PS       | Copolymérisation   | 150 - 200 nm              | NP       | ICP-MS                           | 1 µg L <sup>-1</sup>                     | boue station<br>épuration <sup>41</sup> ,<br>organisme<br>vivant <sup>119-123</sup> ,<br>biofilm <sup>124</sup> ,<br>plante <sup>125</sup> , eau<br>potable <sup>126</sup> | 41        |
| In              | PET      | Extrusion  | 30 x 500 µm<br>(fibres)   | MP       | ICP-MS                           | 3,6 10 <sup>4</sup> part L <sup>-1</sup> | boue station<br>d'épuration  | 114       |
| Ir              | PET      | Broyage puis exposition en<br>solvant organique                              | 200 nm, 900 nm,<br>2,5 µm | MP et NP | ICP-MS                           | pas de donnée                            | souris, sédiment   | 115       |
| Eu              | PS       | Gonflement-diffusion en<br>solvant organique                                 | 200 nm                    | NP       | ICP-MS +<br>microscopie fluo     | pas de donnée                            | plante (laitue,<br>blé)  | 116       |
| Au, Pt<br>ou Pd | PS, PMMA | Copolymérisation puis<br>exposition au sel métallique<br>et réduction par UV | 300 - 500 nm              | NP       | SEM-EDS + SP-<br>ICP-MS + ICP-MS | 5 10 <sup>3</sup> part L <sup>-1</sup>   | sédiment   | 117       |
| Au              | PE, PVC  | Emulsion huile dans eau  | 50 - 350 nm               | NP       | SC-ICP-MS + TEM                  | 1 ng L <sup>-1</sup>                     | souris, humain   | 118       |

Cette étude bibliographique portant sur les micro- nanoplastiques a permis de présenter les connaissances actuelles en termes de pollutions plastiques et des mécanismes de dégradation de ce matériau conduisant à sa fragmentation en micro- nanoplastiques. La deuxième partie a présenté les méthodes analytiques dédiées à l'analyse de ces particules en termes de caractérisations (morphologie, surface, dimension), d'identification chimique et de quantification. Une sous-partie s'est également intéressée aux polluants métalliques que ces particules peuvent contenir et transporter. Cette sous-partie a mis en évidence un manque de matériaux de référence pour la calibration de certains instruments analytiques comme la LA-ICP-MS. Enfin, la dernière partie de ce chapitre a présenté les stratégies utilisées par les chercheurs pour étudier le transport et les interactions de ces polluants *via* des études en laboratoire. Cette stratégie passe ainsi par le développement de modèles de micro- nanoplastiques marqués pour faciliter l'identification et la quantification de ces particules à des concentrations environnementales et dans des matrices environnementales.





**Chapitre 2 : Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués**  
**métalliquement**



## Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| Glossaire .....  | 71  |
| 1. Introduction.....   | 73  |
| 2. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques.....                 | 75  |
| 2.1. Synthèse des particules de PS réticulé .....  | 76  |
| 2.2. Marquage des particules de PS réticulé .....  | 83  |
| 2.3. Étude de la désorption du marqueur .....  | 87  |
| 3. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques..... | 90  |
| 3.1. Synthèse des nanoparticules d'or .....  | 91  |
| 3.1.1. Synthèse des nanoparticules d'or en dispersion aqueuse .....                                      | 91  |
| 3.1.2. Synthèse des nanoparticules d'or en dispersion organique .....                                    | 97  |
| 3.2. Optimisation de la nanoprécipitation du PS.....   | 99  |
| 3.3. Marquage des particules de PS .....   | 105 |
| 3.3.1. Co-nanoprécipitation de PS et de nanoparticules d'or dans de l'eau.....                           | 105 |
| 3.3.2. Nanoprécipitation de PS dans une dispersion aqueuse de nanoparticules d'or .....                  | 115 |
| 4. Conclusion .....  | 119 |
| 5. Matériels et méthodes .....   | 121 |
| 5.1. Marquage par sorption d'ions métalliques .....  | 121 |
| 5.1.1. Réactifs .....  | 121 |
| 5.1.2. Synthèse des particules de PS réticulé.....   | 121 |
| 5.1.3. Caractérisations des particules de PS réticulé.....   | 122 |
| 5.1.4. Séchage des dispersions de particules de PS réticulé .....  | 123 |
| 5.1.5. Marquage des particules de PS réticulé .....  | 123 |
| 5.1.6. Caractérisations des modèles de nanoplastiques marqués.....                                       | 123 |
| 5.2. Marquage par encapsulation de nanoparticules métalliques.....                                       | 124 |
| 5.2.1. Réactifs .....  | 124 |
| 5.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or .....  | 124 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.3. Nanoprécipitation .....                    | 125 |
| 5.2.4. Polystyrènes et copolymères utilisés ..... | 125 |
| 5.2.5. Caractérisations.....                      | 126 |

## Glossaire

AF4 : fractionnement par couplage flux – force à flux croisés

AA : acide acrylique

AFM : microscopie à force atomique

AIBN : 2,2'-azobisisobutyronitrile

ag : attogramme, 1 ag =  $10^{-18}$  g

APS : persulfate d'ammonium

CES : chromatographie d'exclusion stérique

$d_H$  : diamètre hydrodynamique

$d_E$  : diamètre équivalent

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DMF : N-N-diméthylformamide

DVB : divinylbenzène

EDS : spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie

ETM : éléments traces métalliques

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

kcps : kilo coup par seconde

LOD : limite de détection

$M_n$  : masse molaire moyenne en nombre

PAA : poly(acide acrylique)

PDI : indice de polydispersité

PS : polystyrène

PVBA : poly(acide 4-vinylbenzoïque)

RPS : résonance plasmonique de surface

SBL : Sparse Bayesian Learning

SEM : microscopie électronique à balayage

SP-ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique

$T_{amb}$  : température ambiante

TEM : microscopie électronique à transmission

THF : tétrahydrofurane

VBA : acide 4-vinylbenzoïque

### 1. Introduction

Avec l'avènement de la production et de l'utilisation de plastiques depuis les années 1950, la quantité de plastiques retrouvée dans l'environnement croît à un rythme très soutenu<sup>20,127</sup>. Ces plastiques subissent des dégradations<sup>13,16</sup> dans leurs milieux qui conduisent indéniablement à la réduction de leurs dimensions. Des termes définissant ces débris ont alors vu le jour, comme les microplastiques<sup>8</sup>, dont les dimensions sont comprises entre 1 µm et 5 mm, et les nanoplastiques<sup>10</sup>, de tailles comprises entre 1 nm et 1000 nm. Alors que les microplastiques ont des dimensions permettant une visualisation par un grand nombre de techniques analytiques, c'est moins le cas pour les nanoplastiques<sup>128</sup>. En effet, ces particules ont des dimensions très petites et leurs masses ainsi que leurs concentrations environnementales sont très faibles. Ainsi, pour pouvoir analyser ces nanoplastiques, il est nécessaire d'avoir recours à des étapes de préparation, de séparation et de concentration des échantillons<sup>129</sup>. Par ailleurs, pour réaliser des études en laboratoire visant à caractériser le comportement des nanoplastiques dans l'environnement (agrégation, toxicité, dégradation, ...), les recherches ne peuvent pas s'appuyer sur des prélèvements *in situ* du fait des très faibles concentrations dans l'environnement et des milieux complexes dans lesquels ils sont. C'est donc vers des nanoplastiques modèles que les chercheurs se tournent.

Quand les recherches ont commencé dans le domaine, les équipes utilisaient des standards commerciaux (latex) qu'ils ont détourné de leurs usages initiaux, mais la présence d'additifs dans ces standards qui induisait une toxicité accrue a rapidement été démontrée notamment lors d'études (éco)-toxicologiques<sup>105</sup>. Par la suite, divers matériaux modèles ont été élaborés par des équipes de recherche (voir Chapitre 1 pour plus de détails). Dans un premier temps, ces modèles étaient constitués d'une matrice polymère seulement<sup>130</sup>. Puis ces modèles ont inclus un traceur pour permettre leurs suivis dans les milieux d'études. Parmi les différents traceurs, sont notamment retrouvés des traceurs fluorescents<sup>109</sup>, isotopiques<sup>112</sup> et métalliques<sup>41</sup>. Les traceurs fluorescents sont intéressants car ils permettent une visualisation en continu *via* un microscope par exemple, mais souffrent de nombreux inconvénients tels que la diminution de l'intensité de fluorescence (photoblanchiment)<sup>131</sup>, des interférences avec la fluorescence naturelle des substrats environnementaux ou la lixiviation des traceurs<sup>132</sup>. Les modèles contenant un traceur isotopique sont obtenus par polymérisation de monomères isotopiques ce qui permet de garantir que le traceur est bien fixé par liaisons chimiques au nanoplastique modèle, mais le nombre d'études reportant la synthèse de ce type de modèles est peu élevé<sup>112</sup>. Le dernier type est le traceur métallique qui peut être introduit dans le nanoplastique modèle par sorption, piégeage ou liaisons chimiques. La nature du traceur métallique peut ainsi être ionique ou particulaire. De plus, ce traceur est facilement identifiable et quantifiable grâce à de nombreuses méthodes analytiques développées pour l'étude des métaux. Le développement de

modèles de nanoplastiques marqués avec un traceur métallique est donc une technique prometteuse et efficace pour améliorer la compréhension du comportement des nanoplastiques.

Dans notre étude, nous nous sommes imposés plusieurs contraintes pour proposer de nouveaux modèles de nanoplastiques marqués métalliquement. Tout d'abord, les nanoplastiques modèles doivent être exempts d'additifs pouvant engendrer une toxicité non attribuable aux nanoplastiques eux-mêmes. Cela se traduit par exemple par l'absence de tensio-actifs pendant l'étape de polymérisation mais également par le confinement du traceur métallique. Le métal ne doit en effet pas se désorber au cours de son utilisation et être en contact direct avec le milieu d'étude. La deuxième contrainte a été la synthèse de nanoplastiques de formes sphériques afin de pouvoir contrôler la surface des modèles. Avec un modèle sphérique, des paramètres tels que la taille (et la surface développée) et la charge de surface sont facilement caractérisables. La dernière contrainte a été de contrôler la quantité de marqueur métallique au sein des modèles. En effet, la quantité de marqueur doit être suffisamment élevée pour être détectable et suffisamment faible pour ne pas alourdir le nanoplastique modèle et modifier son comportement intrinsèque. Ainsi, pour développer nos modèles de nanoplastiques marqués, nous avons choisi deux stratégies, la première a été le piégeage de cuivre ionique par sorption dans des modèles de nanoplastiques réticulés, la deuxième stratégie a été l'encapsulation de nanoparticules d'or dans des nanoplastiques par un procédé de nanoprécipitation.

Ce chapitre présente l'élaboration de chacun de ces modèles marqués en utilisant des procédés de polymérisation en voie dispersée aqueuse (émulsion) sans tensio-actif<sup>81</sup> ou par nanoprécipitation<sup>133</sup>. Les modèles ont été caractérisés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (SP-ICP-MS) afin de quantifier les traceurs par nanoplastique, ainsi que par microscopie électronique à balayage couplée à une sonde de spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (SEM-EDS) et par microscopie électronique à transmission (TEM) pour visualiser la morphologie et réaliser la cartographie élémentaire des modèles. Enfin, les phénomènes de désorption du traceur ont été quantifiés.

## 2. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques

La synthèse de nanoplastiques modèles marqués par sorption d'ions métalliques repose sur deux étapes : la synthèse du nanoplastique modèle de polystyrène (PS) par polymérisation en voie dispersée aqueuse (émulsion) sans tensio-actif puis la sorption de l'ion métallique au cœur des particules de PS. La sorption d'ions métalliques repose sur le gonflement de particules de PS en solvant organique contenant des ions métalliques solubilisés (Figure 2. 1). Pour cette étape, le solvant organique doit être un bon solvant du PS mais les particules de PS ne doivent pas se solubiliser pour autant. À cet effet, il a été nécessaire de développer la synthèse de particules de PS réticulé en s'appuyant sur le protocole développé par notre équipe<sup>81</sup>. Les modèles réticulés visés sont synthétisés en polymérisation en émulsion sans tensio-actif, ils sont de taille monodisperse et présentent des surfaces oxydées.

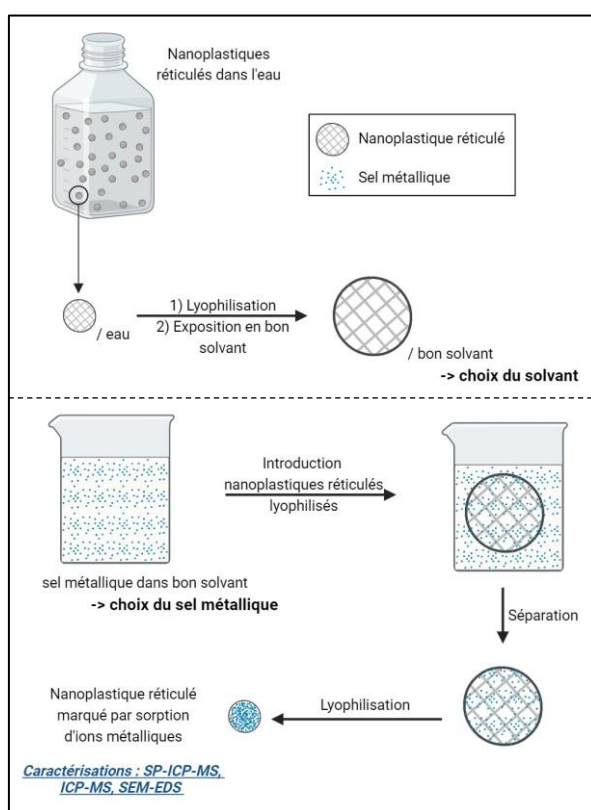


Figure 2. 1 : Schéma de la stratégie de l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques

Après optimisation du protocole de polymérisation avec l'introduction de l'agent réticulant, il a été nécessaire de trouver le solvant organique permettant le gonflement des particules pour y introduire une quantité suffisante de métal en leurs cœurs. Ce solvant devait également être capable de solubiliser à une concentration suffisante le sel métallique toujours dans le but d'introduire un maximum d'ions métalliques au sein des particules.

### 2.1. Synthèse des particules de PS réticulé

Pour la synthèse des nanoplastiques modèles réticulés, le protocole de copolymérisation en émulsion de styrène et d'acide acrylique (AA) développé par notre équipe<sup>81</sup> a été adapté avec l'ajout d'un réticulant. La stratégie vise à obtenir un réseau tridimensionnel dans lequel les chaînes macromoléculaires de PS sont liées de façon covalente par des nœuds de réticulation pour permettre le gonflement des chaînes en bon solvant tout en évitant leur solubilisation (Figure 2. 2).

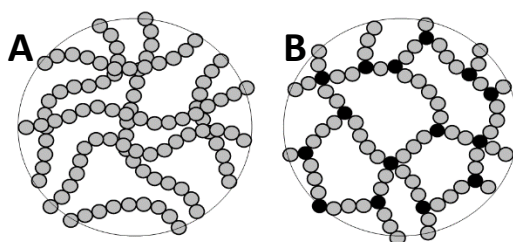


Figure 2. 2 : Structures d'un polymère A) non réticulé et B) réticulé. Les nœuds de réticulation sont représentés par les ronds noirs

Pour ces synthèses, c'est le divinylbenzène (DVB) qui a été choisi comme agent réticulant, il est couramment utilisé en présence de styrène<sup>134</sup>. Son utilisation en présence d'acide acrylique est également reportée<sup>135</sup>. L'avantage de cet agent réticulant est que sa structure chimique étant très proche de celle du styrène, cela permet de synthétiser des particules ayant le comportement et les propriétés du PS.

La transposition simple du protocole déjà décrit par notre équipe pour la synthèse de nanoplastiques modèles à partir de styrène et d'acide acrylique<sup>81</sup> a été l'ajout des monomères styrène et DVB en même temps avant l'amorçage. Cette stratégie a conduit à l'obtention d'une quantité importante d'agrégats (55%). Le filtrat contenait des particules de tailles supérieures au micromètre (9000 nm par analyse de diffusion dynamique de la lumière, DLS) avec un indice de polydispersité (PDI) de 0,3 et la dispersion filtrée présentait un taux de solide de 0,82%. Les travaux de thèse d'Antoine Aynard<sup>80</sup> soutenus en décembre 2022 ont permis de définir les différentes étapes de cette polymérisation en voie dispersée aqueuse. Aux premiers instants de la réaction, c'est le monomère hydrophile (acide acrylique, AA) qui réagit majoritairement, amorcé par l'amorceur hydrosoluble (persulfate d'ammonium, APS), une très faible proportion de styrène provenant de la fraction soluble en phase aqueuse peut aussi réagir. Les oligomères constitués d'unités AA en très grande majorité et de quelques unités de styrène, précipitent une fois la longueur  $j_{crit}$  atteinte pour générer les particules précurseurs (environ 15% de conversion de la polymérisation). Les particules précurseurs ne sont pas suffisamment stables dans le milieu et elles coagulent ensuite pour former des particules stabilisées par une surface hydrophile d'unités AA recouvrant le cœur hydrophobe d'unités styrène (jusqu'à 30% de conversion de la polymérisation), ces

particules sont alors appelées particules primaires. Ces deux étapes (nucléation et précipitation) constituent le mécanisme appelé nucléation homogène (intervalle I de la réaction dans la théorie de Smith-Ewart<sup>136</sup>). La polymérisation a ensuite lieu au cœur de ces particules primaires par transfert de styrène depuis les réservoirs de monomère hydrophobe.

En présence de réticulant, le système est modifié. Même si le DVB a une solubilité dans l'eau moindre que le styrène (à 20°C, solubilité styrène = 300 mg L<sup>-1</sup> ; solubilité DVB = 50 mg L<sup>-1</sup>, valeurs de l'agence européenne des produits chimiques, ECHA), la formation de ponts de réticulation dès la formation des oligomères n'est pas à exclure. La formation et la stabilité des particules précurseurs et des particules primaires sont alors affectées. Par exemple si la longueur  $j_{crit}$  est atteinte plus tôt, plus de particules primaires peuvent être générées. Pour rappel, pour ces synthèses, le ratio molaire [monomère hydrophile] / [monomères hydrophobes] est fixe et égal à 18%. À conversion égale, quand le nombre de particules primaires formées varie, la densité de poly(acide acrylique) (PAA) en surface varie et la stabilité de l'émulsion peut être dégradée. De plus, la position des unités de AA en surface est liée à la balance hydrophile/hydrophobe entre le AA et les monomères hydrophobes (styrène et DVB). Une variation des propriétés des monomères hydrophobes peut aussi affecter la position des unités de AA en surface et dégrader la stabilité des particules finales. Pour éviter ce phénomène d'agrégation, le DVB est ajouté après le début de la réaction de polymérisation afin de ne pas perturber la formation des particules précurseurs et primaires. Dans les mêmes conditions de polymérisation mais en absence de DVB, une conversion d'environ 30% est obtenue après 1h30, garantissant la formation des particules primaires stables<sup>80</sup>. Afin de ne pas perturber le système, le DVB est ajouté goutte-à-goutte 1h30 après l'ajout de l'amorceur, pendant 1 heure puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation 4h30 supplémentaires. Après purification, les particules sont caractérisées et leurs propriétés physico-chimiques sont reportées dans le Tableau 2. 1. Pour comparaison, les caractéristiques d'un nanoplastique modèle synthétisé dans les mêmes conditions mais en absence de DVB sont reportées également. L'ajout d'un réticulant dans les particules de PS, 1h30 après le début de la synthèse, a tendance à augmenter légèrement le diamètre des particules (352 nm contre 320 nm sans réticulant) et diminuer la quantité de COOH en surface (26 COOH nm<sup>-2</sup> contre 45 nm<sup>-2</sup>). Étant donné que la quantité d'acide acrylique dans ces deux synthèses est la même (21 mmol), des fonctions carboxyliques sont sans doute placées au cœur des nanoplastiques modèles et non en surface sans que cela n'impacte la stabilité des échantillons, puisque la valeur du potentiel zêta reste similaire.

Tableau 2. 1 : Caractéristiques physico-chimiques de PS18AADVB et de PS18AA. Diamètres ( $d_H$ ) déterminés par DLS (algorithme des cumulants), concentrations déterminées par méthode gravimétrique, potentiels zêta déterminés par zétamétrie et quantités de COOH en surface déterminées par dosage acido-basique

| <b>Echantillon</b> | <b>DVB</b> | <b>Diamètre <math>d_H</math><br/>(nm) ; PDI</b> | <b>Concentration<br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Potentiel <math>\xi</math><br/>(mV)</b> | <b>Qte COOH<br/>/ nm<sup>2</sup></b> |
|--------------------|------------|---|--|--|--------------------------------------|
| PS18AADVB          | oui        | 352 ; 0,04                                      | 59 000                                       | - 14                                       | 26                                   |
| PS18AA             | non        | 320 ; 0,06                                      | 67 000                                       | - 15                                       | 45                                   |

Ces particules synthétisées en présence de DVB sont considérées comme des nanoplastiques modèles, elles sont de tailles inférieures au micromètre, composées de polystyrène et fonctionnalisées en surface par des fonctions carboxyliques mimant l'oxydation des débris plastiques vieillis dans l'environnement. Des analyses de microscopie à force atomique (AFM) ont été menées afin de visualiser leur morphologie (PS18AADVB) en la comparant à nouveau à des nanoplastiques modèles synthétisés sans DVB (PS18AA). Les images sont reportées Figure 2. 3 et ne montrent aucune différence notable entre ces deux types d'échantillons. L'ajout de DVB au cours de la synthèse ne semble pas modifier la morphologie des échantillons.

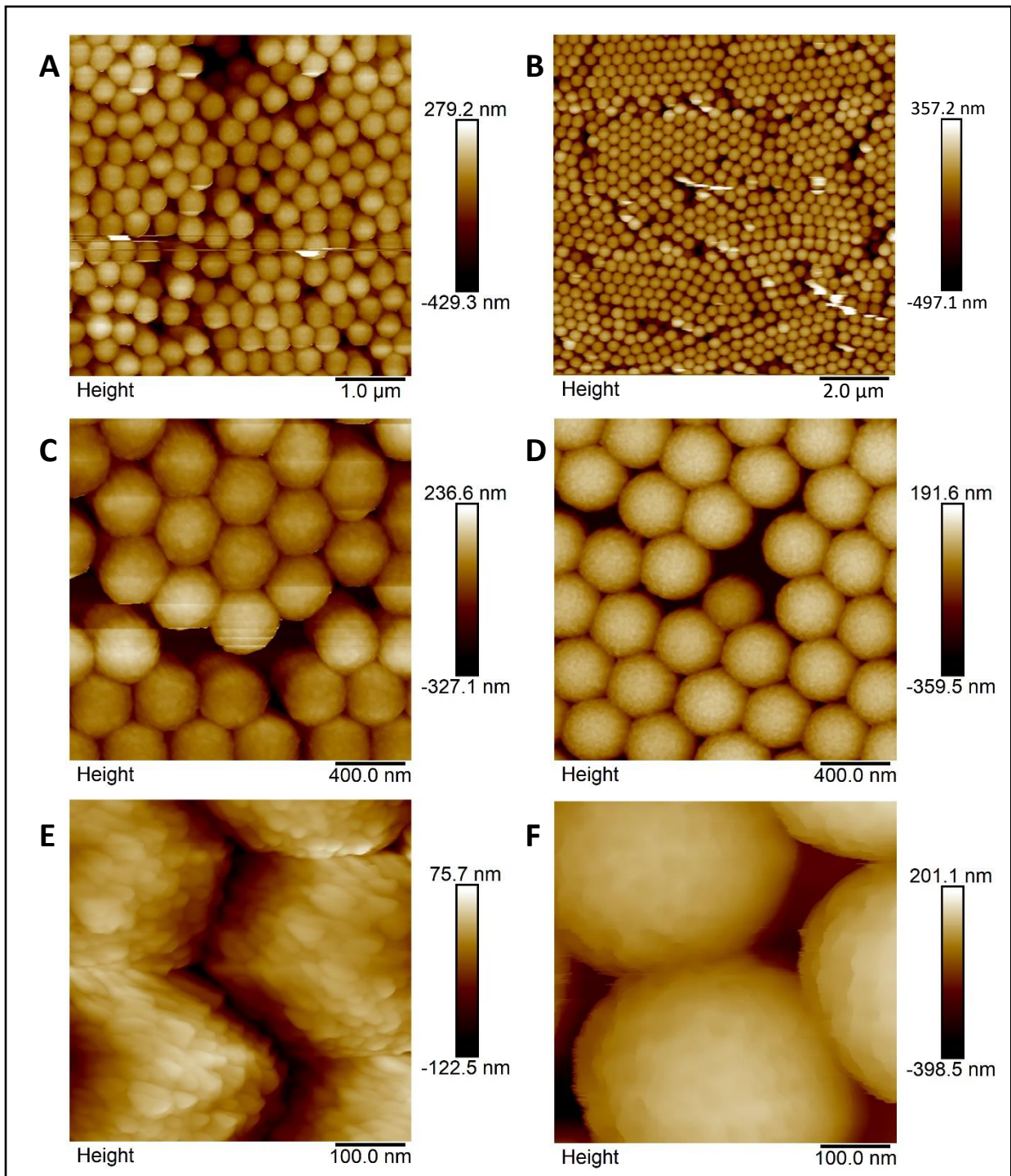


Figure 2. 3 : Images en AFM (topographie) des nanoplastiques modèles, A-C-E) PS18AADVB et B-D-F) PS18AA. PS18AADVB est composé de 18% molaire d'AA et de 3% molaire de DVB et PS18AA est composé de 18% molaire d'AA

Il a ensuite été nécessaire de vérifier la présence du réticulant au cœur des particules. Pour ce faire, un échantillon de PS18AADVB et un échantillon de PS18AA ont été lyophilisés puis 0,1 g de nanoplastiques a été mis en dispersion dans un volume de 10 mL d'eau MilliQ ou de très bon solvant du polystyrène, le tétrahydrofurane (THF). Les milieux sont laissés sous agitation pendant 24h avant analyse par DLS et

les diamètres sont comparés à ceux mesurés avant lyophilisation des particules (Tableau 2. 2 et Figure 2. 4).

Tableau 2. 2 : Caractérisation du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB et de PS18AA avant lyophilisation et après 24h d'exposition dans différents solvants (eau MilliQ et THF) par DLS (algorithme des cumulants)

| Echantillon | Solvant    | Avant lyophilisation | $\Delta t = 24h$ |
|-------------|------------|----------------------|------------------|
|             |            | $d_H$ (nm) ; PDI     | $d_H$ (nm) ; PDI |
| PS18AA      | eau MilliQ | 320 ; 0,06           | 321 ; 0,18       |
| PS18AADVB   | eau MilliQ | 352 ; 0,04           | 357 ; 0,03       |
| PS18AA      | THF        | -                    | 44 ; 0,1         |
| PS18AADVB   | THF        | -                    | 544 ; 0,1        |

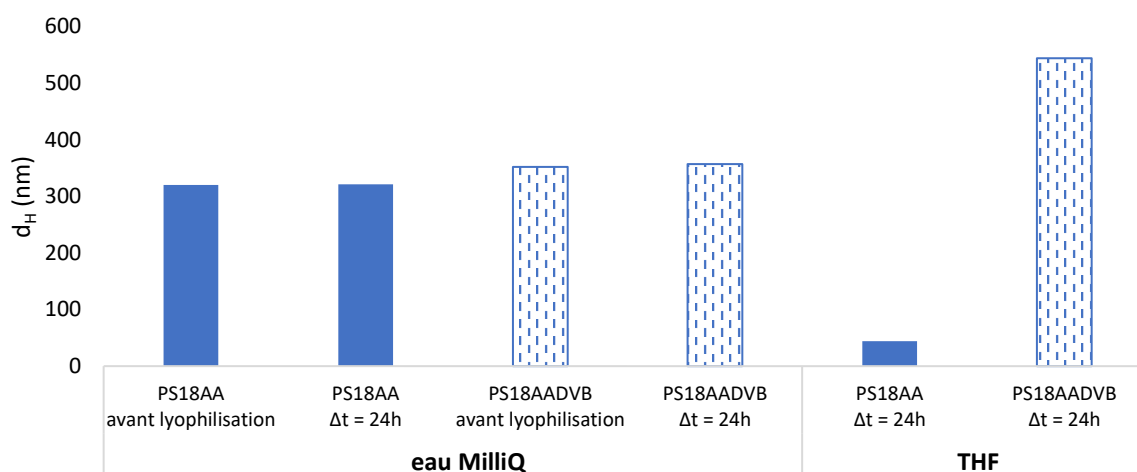


Figure 2. 4 : Evolution du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AA et de PS18AADVB avant lyophilisation et après 24h d'exposition dans différents solvants (eau MilliQ et THF). Diamètres mesurés par DLS (algorithme des cumulants)

Les mesures par DLS des échantillons en début d'exposition n'étant pas concluantes (courbes d'autocorrélation insatisfaisantes car les particules étaient en cours de dispersion), ce sont les diamètres des particules en suspension avant lyophilisation qui sont reportés. Les PS18AA et PS18AADVB avant lyophilisation et après 24h d'exposition, exposés en eau MilliQ, ne présentent pas de variations de diamètre significatives (respectivement de 320 à 321 nm et de 352 à 357 nm). Les échantillons sont stables dans l'eau MilliQ, aucune agrégation ou gonflement des particules réticulées ne sont observés. Les expériences dans le THF ont un comportement différent puisque ce solvant est un bon solvant du polystyrène. À titre d'exemple, une étude<sup>137</sup> a utilisé une concentration en polystyrène dans du THF de 130 g L<sup>-1</sup>. Les particules non réticulées se solubilisent, c'est ce qu'on observe puisque l'analyse par DLS est difficilement réalisable et seules de petites particules (44 nm) sont

mesurables. En revanche, l'analyse des particules réticulées dans ce même solvant met en évidence des diamètres mesurés de 544 nm. En d'autres termes, comme attendu, les nanoplastiques réticulés gonflent en bon solvant de la matrice polymère.

Pour aller plus loin dans l'évaluation du gonflement des nanoplastiques réticulés, cette expérience a été reproduite dans différents solvants organiques et sur des temps plus longs. Pour rappel, l'objectif avec ces nanoplastiques réticulés est de les faire gonfler en bon solvant en présence d'une concentration suffisante en ions métalliques solubilisés. Le gonflement va alors entraîner l'absorption de métaux au cœur des nanoplastiques puis, après des étapes de séparation et de séchage, ce protocole doit conduire à des nanoplastiques modèles marqués métalliquement (Figure 2. 1). Le choix du solvant est donc crucial car il doit permettre à la fois le gonflement des particules de PS réticulé et la solubilisation du sel métallique. Les résultats des évolutions des diamètres des particules au cours du temps sont reportés dans le Tableau 2. 3 et la Figure 2. 5. Aux résultats dans les solvants choisis, ceux obtenus dans l'eau MilliQ sont ajoutés comme référence.

Tableau 2. 3 : Caractérisation du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB exposé dans différents solvants au cours du temps par DLS (algorithme des cumulants). Le DMF est l'acronyme du N-N-diméthylformamide

| Solvant    | $d_H$ (nm) ; PDI |            |             |            |
|------------|------------------|------------|-------------|------------|
|            | 7h               | 24h        | 96h         | 144h       |
| eau MilliQ | 320 ; 0,1        | 357 ; 0,03 | 346 ; 0,002 | 349 ; 0,08 |
| THF        | 403 ; 0,1        | 544 ; 0,1  | 494 ; 0,06  | 401 ; 0,2  |
| Ethanol    | 515 ; 0,05       | -          | 502 ; 0,6   | 328 ; 0,08 |
| DMF        | 343 ; 0,1        | -          | 418 ; 0,006 | 405 ; 0,06 |
| Hexanol    | 1202 ; 0,2       | -          | 1708 ; 0,9  | 1451 ; 3,5 |

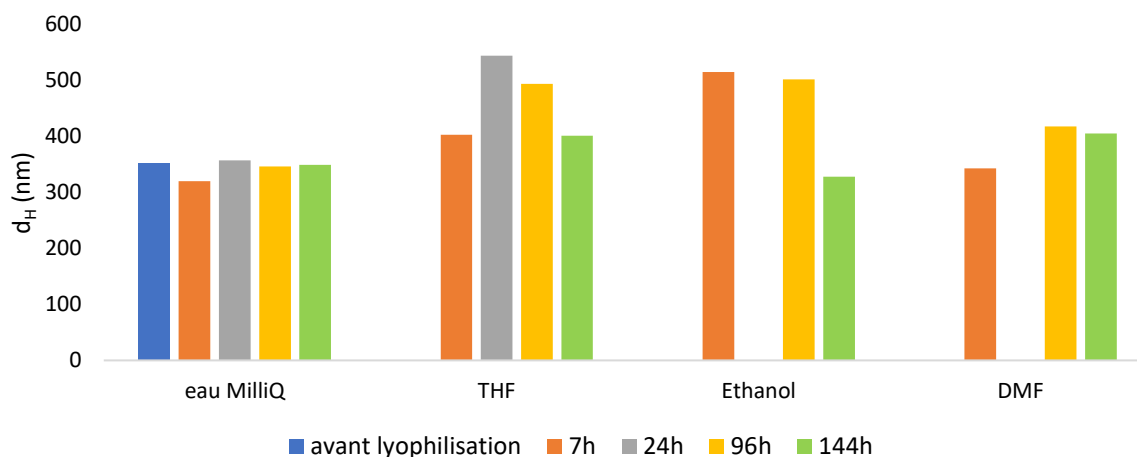


Figure 2. 5 : Evolution du diamètre ( $d_H$ ) de PS18AADVB avant lyophilisation puis exposé dans différents solvants au cours du temps. Diamètres mesurés par DLS (algorithme des cumulants). Le DMF est l'acronyme du N-N-diméthylformamide. Les résultats dans l'hexanol sont supérieurs à 1  $\mu\text{m}$  et ne sont pas représentés dans cette Figure

Comme mentionné ci-dessus (Figure 2. 4), les nanoplastiques réticulés sont stables en milieu aqueux. Dans l'hexanol, les particules atteignent dès 7h des diamètres supérieurs à 1  $\mu\text{m}$  (Tableau 2. 3), l'intégrité du réseau peut être questionnée. Ce solvant a été mis de côté et les résultats ne sont pas présentés dans la Figure 2. 5. Dans le THF, comme vu précédemment (Tableau 2. 2), les diamètres des particules dépassent les valeurs obtenues dans l'eau MilliQ (à  $t = 7\text{h}$ , les particules dans le THF mesurent 403 nm contre 320 nm dans l'eau MilliQ). Au cours du temps, le diamètre de ces particules atteint une valeur maximale à 24h (544 nm) pour finalement se stabiliser après 144h à une taille de 401 nm. Cette valeur correspond au premier diamètre mesuré au bout de 7h d'exposition (403 nm). Finalement, après un phénomène de gonflement, un phénomène de contraction qui correspond à la stabilisation des particules est observé. Dans l'éthanol, le même phénomène de contraction est observé : après un gonflement des particules pendant 4 jours, celles-ci finissent par se contracter pour se stabiliser à une taille de 328 nm, soit une valeur inférieure au diamètre mesuré dans l'eau. Enfin, dans le N-N-diméthylformamide (DMF), il existe également un phénomène de gonflement puis de contraction, les particules passant de 343 nm (7h) à 418 nm (96h) puis 405 nm (144h). Ce diamètre final est équivalent aux mesures réalisées dans le THF.

À la vue de ces résultats de gonflement en solvant organique, l'éthanol est mis de côté car un phénomène trop important de contraction est observé après le gonflement. Le THF et le DMF, qui permettent une augmentation de 112% du diamètre des particules sont donc les deux solvants retenus. La solubilisation d'un sel métallique dans ces deux solvants est étudiée afin de déterminer le solvant adéquat qui permettra une introduction suffisante de métaux ioniques au cœur des nanoplastiques réticulés.

## 2.2. Marquage des particules de PS réticulé

Il est reporté dans la littérature que l'ajout d'un réticulant comme le DVB dans la structure du PS permet d'introduire et de piéger des ions et des molécules. Cette technique est notamment utilisée pour faire de l'extraction en phase solide afin d'extraire et de concentrer les analytes d'une matrice complexe avant caractérisation<sup>138-140</sup>. Dans ces travaux de thèse, le marquage des nanoplastiques réticulés modèles repose sur une exposition à un sel métallique solubilisé en milieu organique bon solvant du PS. Le sel métallique choisi est le cuivre en raison d'une bonne réponse analytique avec les techniques d'ICP-MS, de l'absence d'interférences, et de la possibilité de s'appuyer sur des études déjà réalisées par notre équipe sur cet élément<sup>80</sup>.

DMF et THF sont les solvants choisis dans l'étape développée ci-dessus, ces derniers doivent aussi solubiliser le sel de cuivre à une concentration suffisante pour assurer une concentration en traceur détectable dans le nanoplastique après séchage. Dans les tests réalisés jusqu'à présent, 0,1 g de nanoplastiques a été ajouté dans 10 mL de solvant et des particules de diamètre moyen de 403 nm sont obtenues (moyenne des mesures dans le THF et dans le DMF). Cette concentration et ce diamètre correspondent à une concentration en nanoplastiques réticulés de  $2,8 \cdot 10^{12}$  part L<sup>-1</sup>. Pour être à la fois détectable en SP-ICP-MS et ne pas modifier significativement la densité du modèle marqué, la quantité de cuivre par particule doit se situer entre 40 et 3500 ag ( $1 \text{ ag} = 10^{-18} \text{ g}$ ). Une masse de 3500 ag correspond ainsi à une augmentation de 10% de la densité du modèle par rapport à celle du PS (1,145 contre 1,04 pour le PS). Enfin, le dernier paramètre dont il est nécessaire de tenir compte est le coefficient de partage  $\alpha$  qui définit l'équilibre existant entre le cuivre qui pénètre dans le modèle de nanoplastique ( $[\text{Cu}]_{\text{PS}}$ ) et le cuivre qui reste libre dans le solvant organique ( $[\text{Cu}]_{\text{solvant}}$ ) (Equation 1).

$$\alpha = \frac{[\text{Cu}]_{\text{PS}}}{[\text{Cu}]_{\text{solvant}}} \quad \text{Equation 1}$$

À partir de ces données, des valeurs minimales de concentration en cuivre en solvant organique pour réaliser des nanoplastiques modèles suffisamment marqués en fonction du coefficient de partage  $\alpha$  ont été calculées et sont reportées dans le Tableau 2. 4.

Tableau 2. 4 : Concentrations en cuivre théoriques nécessaires pour l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption de cuivre métallique

| m Cu/part (ag part <sup>-1</sup> ) | Densité du modèle marqué | Coefficient de partage $\alpha$ | [Cu] (mg L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| 40                                 | 1,057                    | 1                               | 11,2                       |
|                                    |                          | 0,1                             | 112                        |
|                                    |                          | 0,01                            | 1 120                      |
| 3 500                              | 1,145                    | 1                               | 982                        |
|                                    |                          | 0,1                             | 9 820                      |
|                                    |                          | 0,01                            | 98 200                     |

En considérant un coefficient de partage égal à 1, c'est-à-dire qu'il y a autant de cuivre dans les nanoplastiques que dans le solvant organique, la concentration en cuivre dans le solvant doit être de 11 mg L<sup>-1</sup> (pour une concentration en traceur de 40 ag de Cu part<sup>-1</sup>) ou de 982 mg L<sup>-1</sup> (pour une concentration en traceur de 3 500 ag de Cu part<sup>-1</sup>). Dans le cas le moins favorable, où le coefficient de partage est de 0,01 ; c'est-à-dire que pour 100 atomes de cuivre présents dans le solvant organique, seulement un atome de cuivre pénètre dans chaque nanoplastique, ces concentrations doivent être de 1 120 mg L<sup>-1</sup> (40 ag de Cu part<sup>-1</sup>) à près de 100 000 mg L<sup>-1</sup> (3 500 ag de Cu part<sup>-1</sup>). Concernant la masse de cuivre par particule marquée, elle ne doit pas augmenter de plus de 10% la densité du matériau (soit une masse de cuivre par particule inférieure à 3 500 ag) et être au-delà de la limite de détection (LOD).

Tableau 2. 5 : Etude de la saturation en Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dans le DMF et le THF

| Solvant | Concentration en cuivre (mg L <sup>-1</sup> ) | Saturation dépassée ? |
|---------|---|-----------------------|
| DMF     | 106 000                                       | Non                   |
| THF     | 5 600   | Oui                   |

A partir de ces résultats théoriques, des tests de solubilité du nitrate de cuivre dans le DMF et le THF ont été réalisés. Dans 10 mL de solvant organique, des quantités croissantes de nitrate de cuivre ont été ajoutées jusqu'à atteindre la saturation du solvant. Les résultats sont reportés dans le Tableau 2. 5. Dans le THF, la saturation en sel de cuivre est rapidement atteinte (5 600 mg L<sup>-1</sup>) au contraire du DMF dans lequel la saturation n'est pas encore atteinte à une concentration en nitrate de cuivre de plus de 100 000 mg L<sup>-1</sup>. Ainsi, le DMF est le solvant retenu car il est capable de solubiliser près de 20 fois plus

de cuivre que le THF permettant ainsi la possibilité de marquer les nanoplastiques réticulés à une concentration suffisante, notamment si des coefficients de partage faibles ( $\alpha = 0,01$ ) régissent le partage du cuivre entre les nanoplastiques et le solvant organique (Tableau 2. 4).

Pour la synthèse de modèles marqués, dans un premier temps, 10 mg ( $2,8 \cdot 10^{11}$  particules) de nanoplastiques de PS18AADVB lyophilisés ont été ajoutés à 10 mL de DMF contenant 0,1 mg de cuivre. Les nanoplastiques sont laissés 6 jours dans ce milieu sous agitation avant d'être purifiés et séchés. À ces concentrations, les quantités théoriques de cuivre qui pénètrent dans les nanoplastiques modèles en fonction du coefficient de partage  $\alpha$  (Equation 1) sont reportées dans le Tableau 2. 6.

Tableau 2. 6 : Masses de cuivre théoriques par nanoplastique modèle en fonction du coefficient de partage  $\alpha$ , en exposant 10 mg de PS18AADVB dans 10 mL de DMF contenant 0,1 mg de cuivre

| <b>m Cu/part (ag part<sup>-1</sup>)</b> |                                  |                                   |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b><math>\alpha = 1</math></b>          | <b><math>\alpha = 0,1</math></b> | <b><math>\alpha = 0,01</math></b> |
| 356                                     | 36                               | 4                                 |

L'analyse des nanoplastiques modèles a été réalisée par SP-ICP-MS et a permis de détecter des particules, le marquage avec ce protocole fonctionne donc. L'analyse quantitative du marquage des nanoplastiques modèles a permis de quantifier une masse de 58 ag de cuivre par particule. Cette valeur correspond ainsi à un coefficient de partage égal à 0,16. Il est à noter que la mesure expérimentale de la masse de cuivre par nanoplastique présente une limite de détection (LOD) de 30 ag. Cette valeur de LOD est calculée par l'instrument et dépend de nombreux facteurs, comme la déviation standard de la ligne de base, la largeur du pic correspondant au passage d'une particule, la densité du métal, la fraction massique de métal, l'efficacité de détection et le temps de lecture<sup>141</sup>. Avec une LOD de 30 ag, il est nécessaire d'ajuster les conditions pour favoriser plus d'incorporation du cuivre au cœur des nanoplastiques afin de rendre ce marquage plus fiable et quantifiable. Cependant, il faut aussi veiller à ne pas changer le comportement du nanoplastique modèle en modifiant sa densité. Comme indiqué dans le Tableau 2. 4, la quantité de cuivre incorporée dans les nanoplastiques modèles pourrait être augmentée jusqu'à 3 500 ag sans augmenter de plus de 10% la densité du modèle. Dans de futurs travaux, il serait donc possible de réaliser des modèles contenant une quantité de traceur métallique supérieure, permettant de dépasser largement la LOD de l'instrument analytique.

En complément des analyses de SP-ICP-MS qui confirment la présence du marqueur métallique au sein des nanoplastiques modèles, des analyses en SEM-EDS ont été réalisées. Les images obtenues sont reportées dans la Figure 2. 6.

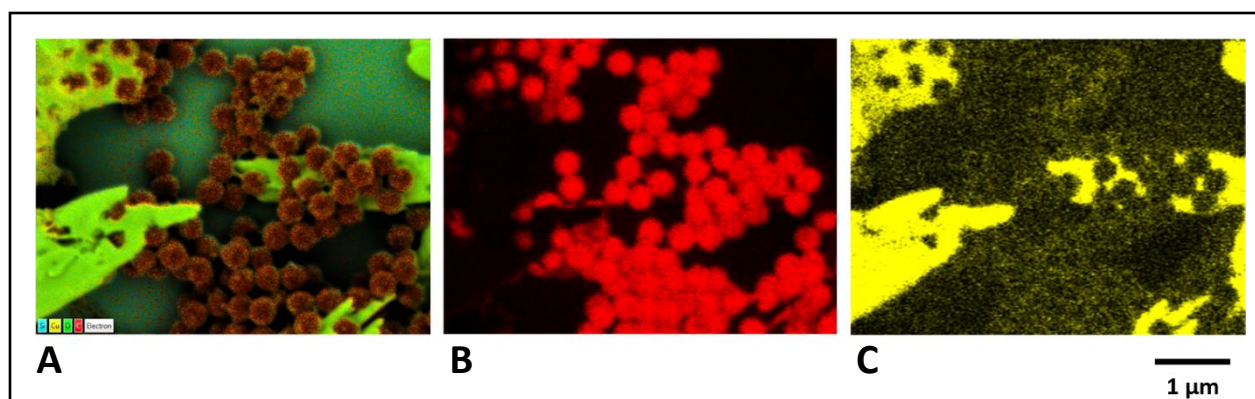


Figure 2. 6 : Images en SEM des nanoplastiques modèles marqués A) composition élémentaire, B) cartographie élément carbone et C) cartographie élément cuivre. Crédit photo : JEOL

Les analyses de microscopie ont été réalisées sur un SEM équipé d'un module de spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (EDS) permettant l'analyse élémentaire et chimique de l'échantillon. L'EDS utilise les rayons X caractéristiques générés dans un échantillon irradié par un faisceau d'électrons pour l'identification des éléments chimiques. Les analyses révèlent ainsi la cartographie de l'élément carbone (Figure 2. 6B) et de l'élément cuivre (Figure 2. 6C). La cartographie de l'élément carbone permet de mettre en évidence les nanoplastiques modèles synthétisés qui sont majoritairement composés de carbone. La cartographie de l'élément cuivre montre la présence de cet élément sur la totalité des nanoplastiques présents sur l'image. Par ailleurs, des amas de cuivre sont visibles dans la Figure 2. 6C, signe d'une mauvaise purification des modèles. Il est donc nécessaire d'optimiser le protocole de purification de ces modèles en vue de leur utilisation dans des études de toxicité.

Ce protocole de marquage a donc permis la synthèse de nanoplastiques modèles marqués par absorption de cuivre métallique. Les nanoplastiques marqués présentent une masse de cuivre de 58 ag par particule permettant leur détection par SP-ICP-MS. Cette valeur reste cependant faible et proche de la LOD. Il serait donc préférable d'augmenter la masse de marqueur par particule. Des calculs théoriques montrent que cette quantité peut être largement augmentée (3 500 ag) sans modifier de plus de 10% la densité de nos nanoplastiques modèles (PS et  $d_H = 400$  nm). Pour augmenter la quantité de marqueur, il peut être envisagé d'augmenter la concentration d'exposition en cuivre lors du protocole de marquage des nanoplastiques modèles puisque cette concentration peut atteindre plus de  $100\,000$  mg L<sup>-1</sup>. Le dernier point à optimiser dans de futurs travaux est le protocole de purification des modèles après marquage, des amas de cuivre étant présents dans les modèles après séchage. Cette purification pourrait se faire en réalisant plusieurs cycles de centrifugation/redispersion.

### 2.3. Étude de la désorption du marqueur

Enfin, pour valider le protocole de synthèse de nanoplastiques modèles marqués par sorption d'ions métalliques, il est nécessaire de connaître la vitesse de désorption du marqueur afin d'en cadrer son utilisation ultérieure. En effet, pour que ces nanoplastiques modèles soient éligibles à des études de toxicité sur des organismes vivants, le marqueur métallique ne doit pas se désorber du nanoplastique au cours de l'exposition. En effet, le sel pourrait être à l'origine d'une toxicité propre et le suivi du nanoplastique ne serait plus possible.

La désorption du cuivre des modèles de nanoplastiques marqués a été étudiée dans un milieu modèle, l'eau MilliQ. 250 mg ( $7 \cdot 10^{12}$  particules) de nanoplastiques modèles marqués lyophilisés ont été dispersés dans 25 mL d'eau MilliQ et placés sous agitation. Cette masse de nanoplastiques modèles représente 0,4 mg de cuivre (pour un marquage moyen de 50 ag de Cu part<sup>-1</sup>), soit dans un volume de 25 mL, une concentration théorique en cuivre totale de 16 mg L<sup>-1</sup>. Deux fractions de cet échantillon ont été analysées, l'une par ICP-MS, l'autre par SP-ICP-MS. L'analyse en ICP-MS a été réalisée pour déterminer la concentration expérimentale en cuivre totale présent dans la fraction de l'échantillon. La valeur expérimentale s'élève ainsi à 12,5 mg L<sup>-1</sup>, soit une valeur inférieure à la concentration théorique. Cet écart peut s'expliquer du fait que la valeur de 58 ag de cuivre qui marquent les nanoplastiques modèles est une moyenne et que des nanoplastiques sont marqués avec une quantité inférieure. L'analyse en SP-ICP-MS quant à elle, qui permet également de quantifier le métal en dehors des particules, visait à déterminer la concentration en cuivre présente dans le surnageant de l'échantillon, c'est-à-dire le cuivre libre, qui s'est désorbé des modèles. Au début de l'expérience, cette concentration est nulle puis, après 34 jours d'exposition en milieu modèle et sous agitation, cette valeur s'élève à 8,1 mg L<sup>-1</sup>. Cette valeur correspond à 65% du cuivre qui marquait les nanoplastiques modèles en début d'expérience. Ainsi, en 34 jours, près de deux tiers des traceurs se sont désorbés des nanoplastiques modèles, ce qui compromet leurs usages dans des études d'(éco)-toxicité. En effet, d'une part les modèles ayant perdus leurs traceurs ne seront plus identifiables et d'autre part, le cuivre va pouvoir interagir avec le milieu d'étude et rajouter une éventuelle toxicité. Cependant, ce résultat correspond à une étude sur 34 jours et il serait intéressant de réaliser l'étude de la désorption sur des temps plus courts et d'étudier la cinétique de désorption. Si la désorption du traceur intervient après quelques jours d'exposition ou bien si la désorption n'est pas trop importante dès le début, ces nanoplastiques modèles pourraient convenir pour des études d'(éco)-toxicologie ne nécessitant pas des durées d'exposition trop longues.

L'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par sorption d'ions métalliques a permis le développement d'un nouveau type de modèles de nanoplastiques de PS réticulé. L'intérêt de l'ajout d'un agent réticulant au cours de la polymérisation réside dans la possibilité de faire gonfler les particules en solvant organique sans pour autant solubiliser les chaînes, grâce à la présence des nœuds de réticulation. Cette synthèse a été possible en adaptant le protocole de copolymérisation en émulsion du styrène et d'acide acrylique développé par notre équipe qui permet d'obtenir des nanoplastiques sphériques et présentant des surfaces oxydées. Après optimisation de ce protocole, les nanoplastiques réticulés modèles obtenus ont un diamètre moyen de 350 nm et une quantité de fonctions carboxyliques en surface de 26 COOH nm<sup>-2</sup>, caractéristiques physico-chimiques proches des nanoplastiques modèles non réticulés. Ces dispersions aqueuses sont stables et les nanoplastiques sont sphériques, monodisperses en taille et oxydés en surface mimant ainsi l'oxydation des débris plastiques vieillis dans l'environnement. L'introduction du réticulant au sein des chaînes de polymère a été vérifiée par DLS en comparant un échantillon de nanoplastiques sans réticulant et un échantillon de nanoplastiques avec réticulant exposés en solvant organique.

Après cette étape, le choix du solvant pour l'absorption du sel métallique a pris en compte le fait qu'il devait à la fois être capable de faire gonfler les nanoplastiques et solubiliser le sel métallique. Après des tests de gonflement sur les nanoplastiques réticulés modèles, le THF et le DMF ont été sélectionnés. La solubilité du sel de cuivre de notre étude (le nitrate de cuivre) dans ces deux solvants a été étudiée et le DMF a été retenu car il présente une valeur de solubilité près de 20 fois supérieure à celle obtenue dans le THF.

Après exposition des nanoplastiques réticulés modèles dans du DMF contenant le sel de cuivre, des analyses de SP-ICP-MS ont révélé une masse moyenne de 58 ag de cuivre par nanoplastiques modèles. Cette stratégie de marquage fonctionne mais cette masse de cuivre sorbé étant proche de la LOD de l'instrument (30 ag), il y a un risque de sous-estimation du nombre de nanoplastiques modèles marqués. Il serait donc nécessaire d'ajuster les conditions pour favoriser plus d'incorporation du cuivre au cœur des nanoplastiques. Enfin, le dernier paramètre étudié est le phénomène de désorption du traceur des nanoplastiques marqués. Si le marqueur se désorbe au cours d'une expérience, alors celui-ci peut entraîner une toxicité dans le milieu d'étude mais également empêcher le suivi du nanoplastique modèle. L'étude de la désorption a été réalisée dans de l'eau MilliQ. Des analyses par spectrométrie de masse ont permis de quantifier la désorption du marqueur à 65% au bout de 34 jours. Ainsi, l'utilisation de ce modèle pour des expériences durant plus d'un mois est compromise. Cependant, il reste nécessaire de caractériser ce phénomène de désorption sur des temps plus courts. Si la désorption est raisonnable ou inexistante en début d'exposition, alors ces modèles pourraient être utilisés pour des études d'(éco)-toxicologie nécessitant des durées d'exposition courtes.

Afin de pallier ces problèmes de désorption du marqueur, une autre voie d'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués a été entreprise. Au lieu de se baser sur la sorption d'un métal sous forme ionique, c'est l'encapsulation de métaux sous la forme de nanoparticules au sein de nanoplastiques modèles qui a été étudiée dans une deuxième stratégie. Cette dernière doit limiter voire empêcher les phénomènes de désorption des traceurs (nanoparticules d'or) en dehors des nanoplastiques modèles marqués obtenus à la fin de ce procédé.

### 3. Élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques

Dans cette seconde stratégie de marquage de nanoplastiques, les nanoparticules métalliques choisies pour leurs encapsulations dans des chaînes de polymère sont les nanoparticules d'or. Ces dernières ont été choisies pour plusieurs raisons (i) leurs protocoles de synthèse sont largement répandus dans la littérature<sup>142</sup> et applicables au sein du laboratoire, (ii) les techniques d'analyses basées sur l'ICP-MS sont tout à fait adaptées à l'analyse des nanoparticules d'or<sup>143</sup>, aucune interférence avec d'autres ions ou fragments moléculaires n'est observée et les LOD atteintes sont très basses (15-20 nm en termes de dimension ou 35-40 ag en termes de masse), (iii) l'or n'étant pas un élément répandu dans l'environnement, il est peu susceptible de se retrouver dans les organismes vivants. L'analyse de modèles marqués à l'or n'est donc pas sujette à des interférences causées par la présence d'or dans les matrices environnementale ou biologique.

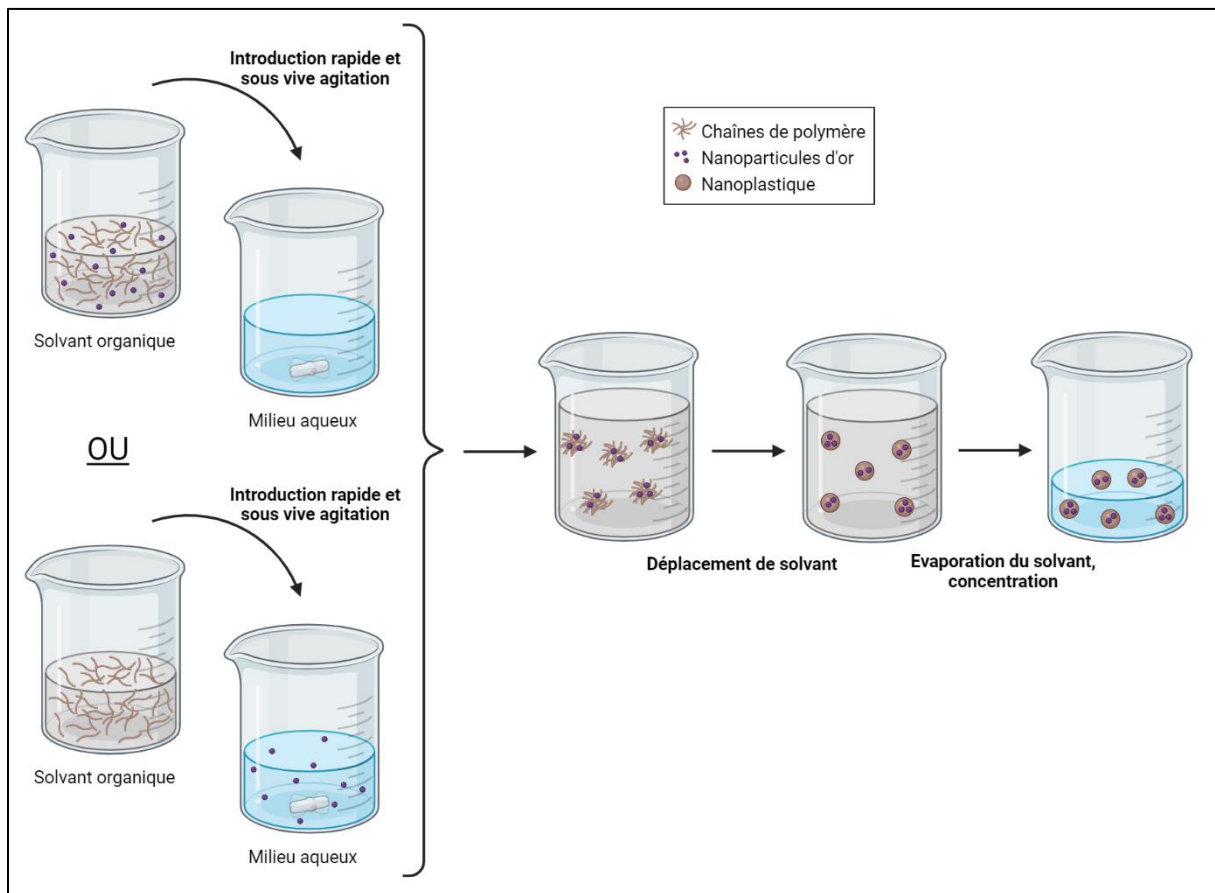


Figure 2. 7 : Schéma des stratégies d'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques par nanoprécipitation

Après synthèse des nanoparticules d'or, celles-ci ont été encapsulées dans un polymère par la méthode de nanoprécipitation (Figure 2. 7). Il s'agit de la précipitation de composés (ici chaînes de polymère

hydrophobe) par un changement de la qualité de solvant (d'un solvant organique vers un milieu aqueux). Pour ces travaux, la méthode de nanoprécipitation par déplacement de solvant, qui utilise deux solvants miscibles<sup>144,145</sup>, a été utilisée. Les chaînes de polymère mises en solution dans un solvant organique volatil, sont rapidement additionnées à une grande quantité d'eau, la sursaturation est rapidement atteinte et des particules de polymère se forment spontanément sous l'effet du changement de la qualité de solvant. Le solvant organique peut ensuite être éliminé par évaporation. Ce procédé est simple, mais nous nous sommes imposés comme contrainte de ne pas utiliser d'additif et d'obtenir des particules de polymère pouvant être considérées comme des nanoplastiques marqués (présence des nanoparticules d'or au cœur des nanoplastiques, stabilité des nanoplastiques dans le milieu, tailles inférieures au micromètre).

### 3.1. Synthèse des nanoparticules d'or

Dans ce protocole de marquage de nanoplastiques modèles par encapsulation de nanoparticules d'or dans les chaînes de polymère, deux stratégies ont été étudiées (Figure 2. 7). La première possibilité est d'exposer les chaînes de polymère solubilisées à une dispersion d'or dans du THF avant de nanoprécipiter le mélange dans le milieu aqueux pour obtenir des nanoplastiques appelés PS\_Au<sub>THF</sub>. La deuxième possibilité est de nanoprécipiter les chaînes de polymère hydrophobes solubilisées dans du THF dans un milieu aqueux contenant des nanoparticules d'or pour obtenir des nanoplastiques appelés PS\_Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>. Ces deux protocoles nécessitent, pour le premier, un lot de nanoparticules d'or dispersées en milieu organique et, pour le deuxième, un lot de nanoparticules d'or dispersées en milieu aqueux. La méthode développée par Mawele Loudy *et al.*<sup>146</sup> permettant l'obtention d'une dispersion de nanoparticules d'or dans du THF et la méthode développée par Turkevich *et al.*<sup>147</sup> permettant l'obtention d'une dispersion aqueuse de nanoparticules d'or ont donc été utilisées et adaptées.

#### 3.1.1. Synthèse des nanoparticules d'or en dispersion aqueuse

Dans la méthode développée par Turkevich *et al.*<sup>147</sup>, le sel d'or (l'acide tétrachloroaurique, H<sub>4</sub>AuCl<sub>4</sub>) est solubilisé dans de l'eau puis réduit par ajout de citrate de sodium. La réaction, décrite en Figure 2. 8, se déroule en 3 étapes qui ont été définies par Ojea-Jiménez *et al.*<sup>148</sup>. La première étape est un échange rapide de ligand du complexe d'or : un ion chlore est remplacé par un anion citrate pour former un complexe intermédiaire. La deuxième étape, plus lente, est l'oxydation du groupement citrate qui conduit à la réduction de Au(III) en Au(I). Enfin, la dernière étape est la dismutation de Au(I) qui conduit à la formation de Au(0) et également du sel d'or initial (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>). Le citrate de sodium joue à la fois un rôle de réducteur et de stabilisant permettant la synthèse de dispersions aqueuses de nanoparticules

d'or stables. Ceci explique également que le ratio molaire réducteur sur or (ratio red/Au) est un paramètre clé qui gouverne la taille des nanoparticules d'or. En effet, en diminuant la quantité de citrate de sodium, les particules primaires sont moins stabilisées et tendent à s'agréger au cours de leur formation, ce qui conduit à la synthèse de nanoparticules d'or de tailles supérieures.

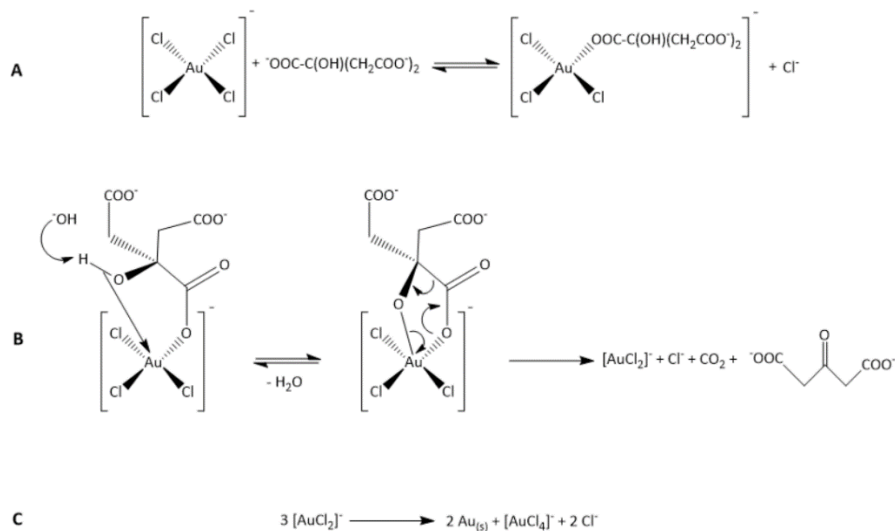


Figure 2. 8 : Etapes de la synthèse de nanoparticules d'or en dispersion aqueuse selon la méthode de Turkevich<sup>148</sup>. A) échange de ligand, B) décarboxylation et C) réduction

Afin de synthétiser des nanoparticules d'or suffisamment lourdes pour être détectées et suffisamment légères pour ne pas alourdir les nanoplastiques modèles, différents ratios red/Au ont été testés dans le but d'obtenir des dispersions de nanoparticules de tailles et de masses différentes. Le Tableau 2. 7 reporte les diamètres des nanoparticules, déterminés par DLS et SP-ICP-MS, les résonances plasmoniques de surface (RPS) des dispersions déterminées par spectroscopie UV-visible ainsi que les concentrations en nanoparticules et les masses d'or par nanoparticule déterminées par SP-ICP-MS.

Tableau 2. 7 : Caractéristiques physico-chimiques de Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>\_1,4 ; Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>\_1,1 ; Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>\_0,9 et Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>\_0,6. Diamètres équivalents ( $d_E$ ) déterminés par DLS (algorithmes des cumulants et SBL) et SP-ICP-MS, résonances plasmoniques de surface (RPS) déterminées par spectroscopie UV-visible et concentrations en nanoparticules et masses d'or par nanoparticule déterminées par SP-ICP-MS. Pour les diamètres déterminés par DLS avec l'algorithme SBL les proportions de chaque population retrouvée sont données entre parenthèses

| Echantillon                      | Ratio<br>red/Au<br>( $n/n$ ) | Diamètre (nm)      |                          |                          |                   | RPS<br>(nm) | Concentration<br>(mL <sup>-1</sup> ) | m (ag) |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------|--------------------------------------|--------|
|                                  |                              | cumulants<br>$d_E$ | SBL<br>$d_{E1}$<br>(75%) | SBL<br>$d_{E2}$<br>(25%) | SP-<br>ICP-<br>MS |             |                                      |        |
| Au <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 1,4 | 1,4                          | 14                 | 42                       | 3                        | 32                | 528         | 361 10 <sup>9</sup>                  | 324    |
| Au <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 1,1 | 1,1                          | 24                 | 50                       | 4                        | 40                | 533         | 241 10 <sup>9</sup>                  | 666    |
| Au <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 0,9 | 0,9                          | 24                 | 60                       | 7                        | 46                | 542         | 123 10 <sup>9</sup>                  | 956    |
| Au <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 0,6 | 0,6                          | 67                 | 80                       | 20                       | 78                | 576         | 24 10 <sup>9</sup>                   | 4877   |

Les tailles des nanoparticules d'or ont été déterminées de trois façons différentes. Par DLS avec les algorithmes des cumulants et de Sparse Bayesian Learning (SBL) ainsi que par SP-ICP-MS. Les analyses de DLS montrent des valeurs différentes suivant l'algorithme choisi. L'algorithme des cumulants prend pour hypothèse la présence d'une seule population d'où l'obtention d'une seule valeur de diamètre. L'algorithme SBL, qui prend pour hypothèse la présence de plusieurs populations, permet de mettre en évidence la présence de deux populations de nanoparticules d'or de tailles différentes dans les échantillons. Cependant, les valeurs de diamètre inférieures à 10 nm correspondent à la limite basse d'analyse de cette technique et ne sont donc pas des valeurs absolues. Les mesures de taille réalisées par SP-ICP-MS se situent entre les deux populations mesurées par DLS. Comme illustré dans la Figure 2. 9 qui prend pour exemple l'analyse de la dispersion Au<sub>H<sub>2</sub>O</sub>1,1, la SP-ICP-MS détecte une large gamme de tailles de nanoparticules allant de 22 nm à plus de 53 nm. La distribution des tailles de ces nanoparticules décrit parfaitement une loi log-normale avec pour valeur médiane 40 nm. La LOD de cette mesure se situe à 15 nm, représentée par le trait rouge hachuré sur la Figure 2. 9, ce qui explique que la seconde population de nanoparticules analysée en DLS ( $d_{E2} = 4$  nm dans cet exemple) ne peut être détectée par SP-ICP-MS. Face à ces différentes valeurs de diamètres obtenues selon la méthode analytique, les valeurs de référence pour la suite de ces travaux de synthèse de nanoparticules d'or seront celles obtenues par SP-ICP-MS.

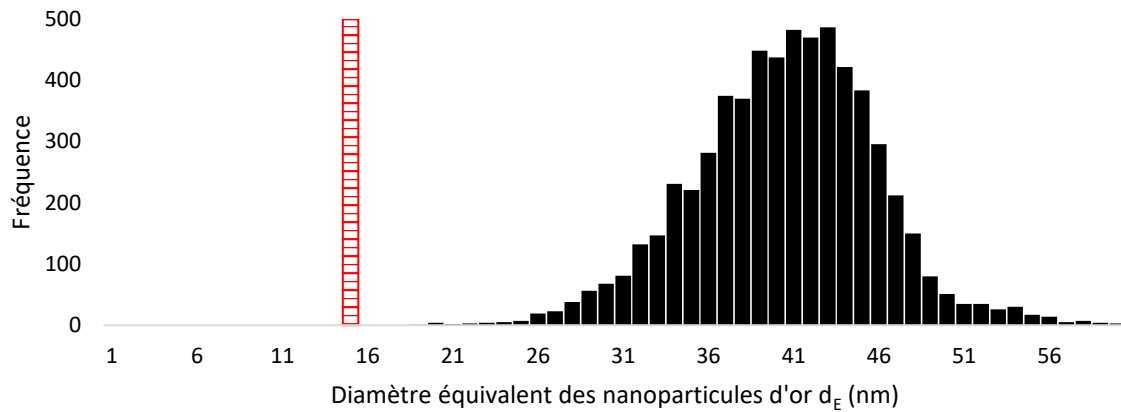


Figure 2. 9 : Distribution des tailles de l'échantillon Au<sub>H2O</sub>1,1 analysé par SP-ICP-MS. Le trait rouge hachuré représente la LOD de la mesure

Les deux autres paramètres présents dans le Tableau 2. 7 qui ont été déterminés par SP-ICP-MS, sont les concentrations en nanoparticules ainsi que les masses d'or par nanoparticule. La concentration en nanoparticules diminue lorsque la taille des nanoparticules augmente. Cette observation est cohérente étant donné que ces 4 dispersions ont été synthétisées à partir de la même quantité de sel d'or. Suivant la même logique, la masse d'or par nanoparticule augmente avec la taille des nanoparticules. D'ailleurs, il est à noter que pour déterminer le diamètre des nanoparticules, la SP-ICP-MS mesure la masse de métal par nanoparticule puis calcule le diamètre équivalent grâce à l'Equation 2.

$$d = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi} \times \frac{m}{10^{15} \times \rho}} \times 10^7 \quad \text{Equation 2}$$

avec d : diamètre équivalent (nm)

m : masse d'or par particule (fg)

ρ : densité de l'or (ρ = 19,3)

Le dernier paramètre présent dans le Tableau 2. 7 est la longueur d'onde correspondant à la résonance plasmonique de surface (RPS) caractérisée par spectroscopie UV-visible. La RPS est une oscillation de densité de charges causée par le rayonnement d'une onde électromagnétique qui va provoquer l'absorption de lumière. La longueur d'onde à laquelle ce phénomène se produit dépend de la taille, de la forme et des états de surface et d'agglomération des nanoparticules. En termes de taille, une augmentation de la dimension des nanoparticules provoque un décalage de la RPS vers des longueurs d'onde plus grandes<sup>149</sup>. Pour ces dispersions, la même tendance est retrouvée puisque la RPS passe de 528 nm pour les nanoparticules de 32 nm à 576 nm pour les plus grosses (78 nm).

Pour rappel, ces travaux de recherche visent à produire des nanoplastiques marqués par des nanoparticules d'or mais dont la quantité exercera une influence faible sur la densité finale du modèle. Dans la deuxième partie de ce protocole de synthèse, les nanoparticules d'or (densité = 19,3) vont en effet être incluses dans des particules de PS (densité = 1,04). La différence de densité entre le traceur et le polymère est de fait très importante (facteur 20) et les nanoparticules d'or ne doivent pas ajouter une masse trop importante pour ne pas alourdir le nanoplastique modèle marqué et modifier ses propriétés intrinsèques. Pour illustrer les limites de ce marquage, la Figure 2. 10, présente l'évolution théorique de la densité des nanoplastiques modèles marqués en fonction de la masse (en diamètre équivalent) des nanoparticules d'or.

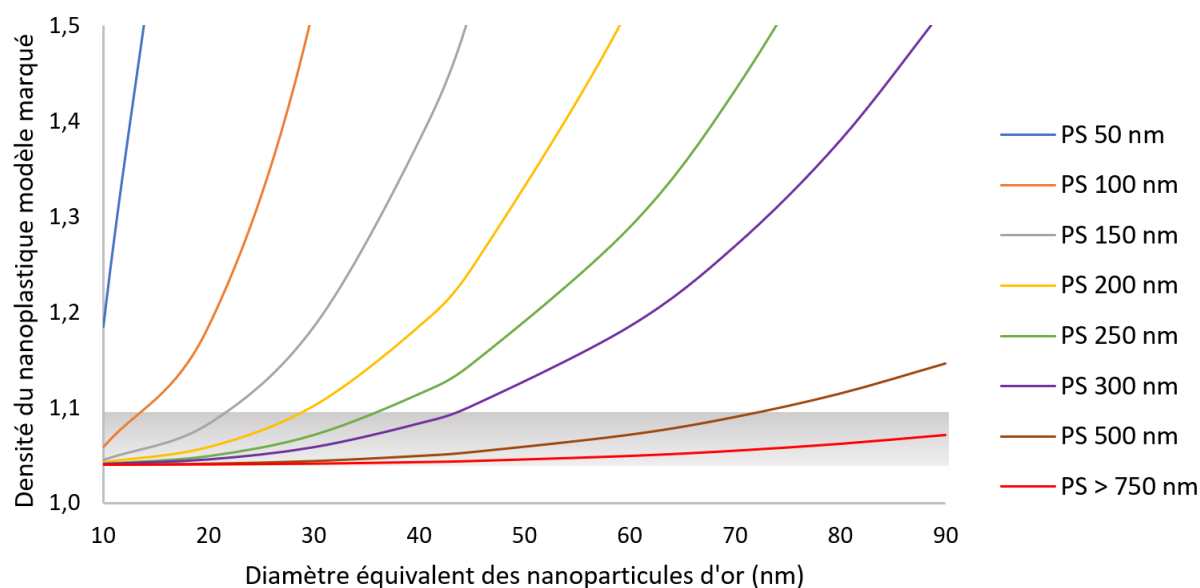


Figure 2. 10 : Evolution théorique de la densité des nanoplastiques modèles marqués en fonction du diamètre équivalent ( $d_E$ ) des nanoparticules d'or compris entre 10 et 90 nm utilisées comme traceur pour des particules de PS de diamètre 50 nm (courbe bleue), 100 nm (courbe orange), 150 nm (courbe grise), 200 nm (courbe jaune), 250 nm (courbe verte), 300 nm (courbe violette), 500 nm (courbe marron) et > 750 nm (courbe rouge). La zone grisée correspond à une densité de modèles comprise entre 1,04 et 1,14

Par exemple, pour des particules de PS de diamètre compris entre 500 et 1000 nm, la densité ne fluctuera pas de plus de 10% avec l'incorporation d'une nanoparticule d'or de diamètre compris entre 10 et 70 nm. Avec les nanoparticules d'or qui viennent d'être synthétisées, et en acceptant une augmentation de la densité des modèles jusqu'à 10% par rapport à la densité du PS, les plus petites ( $d_E = 32$  nm,  $Au_{H_2O}1,4$ ) peuvent convenir pour des nanoplastiques ayant un diamètre supérieur à 200 nm, les nanoparticules d'or de  $d_E = 40$  nm ( $Au_{H_2O}1,1$ ) pour des nanoplastiques de diamètres supérieurs à 250 nm et les nanoparticules d'or de  $d_E = 46$  nm ( $Au_{H_2O}0,9$ ) pour des nanoplastiques de diamètres supérieurs à 300 nm. En revanche, la dispersion contenant des nanoparticules d'or d'un diamètre moyen de 78 nm ( $Au_{H_2O}0,6$ ) ne serait acceptable que pour marquer des PS de plus de 750 nm tout en

conservant une augmentation de densité inférieure à 10%. De fait, cet échantillon ( $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}0,6}$ ) a été mis de côté. En revanche, les échantillons  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,4}$ ,  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,1}$  et  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}0,9}$  ont été caractérisés en TEM afin d'observer leurs morphologies (Figure 2. 11).

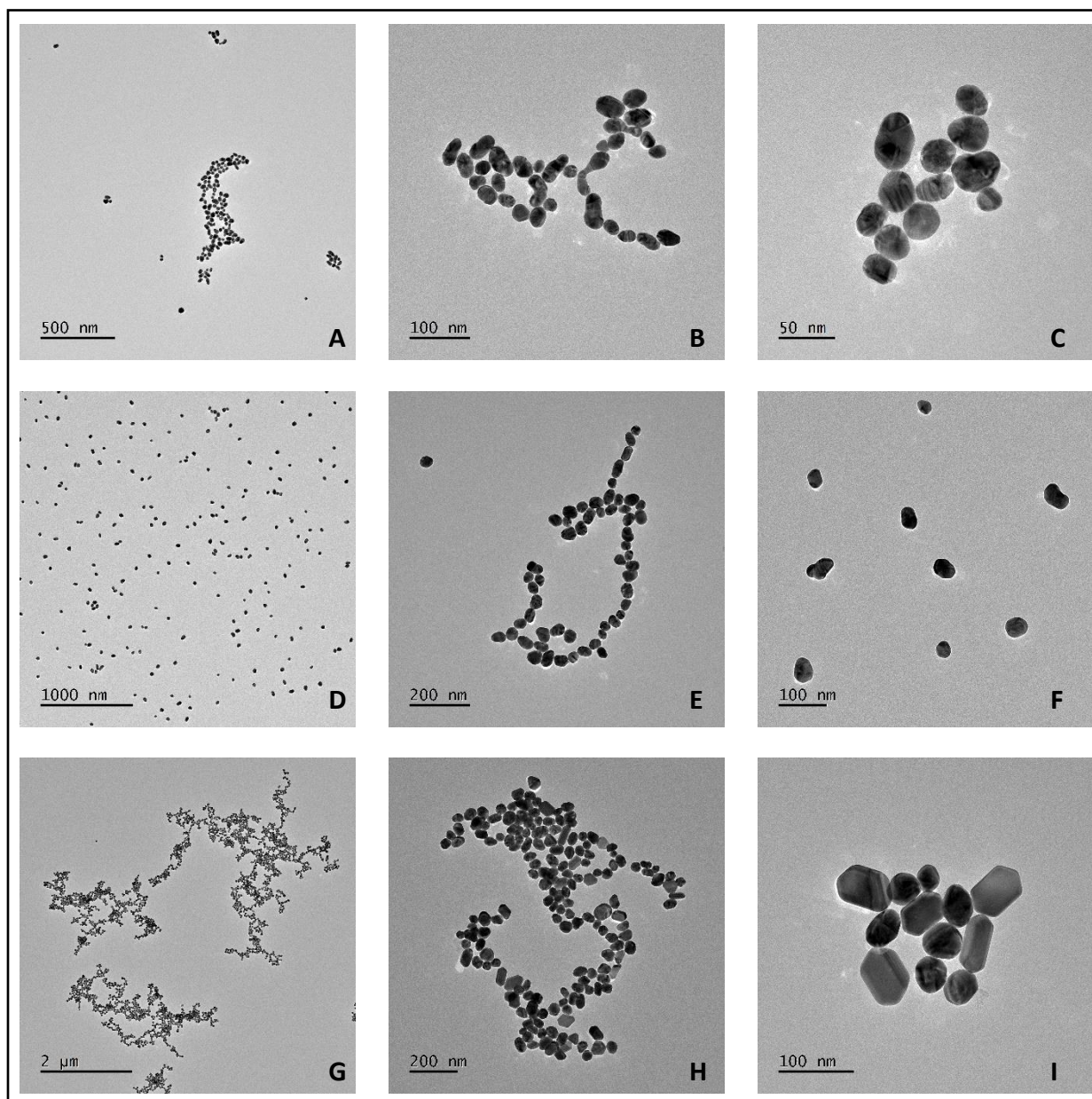


Figure 2. 11 : Images en TEM des différentes dispersions aqueuses d'or. A-B-C)  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,4}$  ; D-E-F)  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,1}$  et G-H-I)  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}0,9}$

La dispersion  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,4}$  est composée de nanoparticules d'or de formes arrondies dont la distribution en taille est centrée sur 30 – 40 nm. La dispersion  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,1}$  présente les mêmes caractéristiques que  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}1,4}$ , c'est-à-dire des nanoparticules de formes arrondies et une distribution plutôt monodisperse (30 – 40 nm). La dispersion  $\text{Au}_{\text{H}_2\text{O}0,9}$  présente des nanoparticules de morphologies plutôt polygonales qui n'ont pas été observées pour les autres dispersions et de tailles légèrement supérieures (40 – 50 nm).

Les synthèses de nanoparticules d'or en dispersion aqueuse selon le protocole de Turkevich ont permis d'obtenir 3 dispersions différentes présentant des caractéristiques, notamment en tailles, intéressantes. Ces nanoparticules vont pouvoir être testées en tant que traceurs pour la synthèse de nanoplastiques modèles marqués dans la suite de ce chapitre.

### 3.1.2. Synthèse des nanoparticules d'or en dispersion organique

Pour rappel, 2 stratégies de marquage pour le développement de nanoplastiques modèles sont étudiées (Figure 2. 7) : l'une repose sur la nanopréciptation de chaînes de polymère dans une dispersion aqueuse de nanoparticules d'or et l'autre sur l'exposition des chaînes de polymère solubilisées dans du THF à une dispersion de nanoparticules d'or dans du THF avant la nanopréciptation du mélange PS\_Au<sub>THF</sub>. La synthèse des dispersions organiques de nanoparticules d'or est décrite ci-après.

Dans ce protocole de synthèse, le principe est le même que la méthode de Turkevich<sup>147</sup> décrite précédemment. À une solution contenant le sel d'or (l'acide tétrachloroaurique, HAuCl<sub>4</sub>) est ajoutée une solution contenant un réducteur mais les deux phases aqueuses sont ici remplacées par des phases organiques. Le THF a été choisi comme solvant et le réducteur utilisé est le tétrahydroborate de sodium (NaBH<sub>4</sub>). Contrairement au citrate de sodium utilisé dans le protocole en phase aqueuse, qui agit comme réducteur et stabilisant, un ligand (le 1-decanethiol) doit être ajouté dans ce protocole pour garantir la stabilité des nanoparticules d'or.

Tableau 2. 8 : Caractéristiques physico-chimiques de Au<sub>THF</sub>. Diamètre équivalent ( $d_E$ ) déterminé par SP-ICP-MS, résonance plasmonique de surface (RPS) déterminée par spectroscopie UV-visible et concentration en nanoparticules et masse d'or par nanoparticule déterminée par SP-ICP-MS

| Echantillon       | Ratio red/Au<br>( $n/n$ ) | Diamètre<br>équivalent $d_E$<br>(nm) | RPS (nm) | Concentration<br>(mL <sup>-1</sup> ) | m (ag) |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------|--------------------------------------|--------|
| Au <sub>THF</sub> | 1,2                       | 21                                   | 511      | 3 10 <sup>9</sup>                    | 89     |

Les caractéristiques physico-chimiques de la dispersion d'or dans du THF synthétisée avec un ratio red/Au = 1,2 sont reportées dans le Tableau 2. 8. Le diamètre moyen a été déterminé à 21 nm par SP-ICP-MS, mais lors de cette session d'analyse, la LOD était de 17 nm, une partie de la distribution de ces nanoparticules n'était donc pas mesurable par SP-ICP-MS (Figure 2. 12). Par ailleurs, ces nanoparticules d'or sont plus petites que celles synthétisées dans l'eau à un ratio red/Au = 1,1 ( $d_E$  = 40 nm) et même

que celle au ratio red/Au = 1,4 ( $d_E = 32$  nm). Cette observation peut s'expliquer par la présence du ligand, le 1-decanethiol, qui a une propriété tensio-active supérieure au citrate de sodium utilisé pour réduire l'or en solution aqueuse. La valeur de la RPS est de 511 nm ici, contre des valeurs comprises entre 528 et 542 nm pour les nanoparticules d'or en dispersion aqueuse. Ce décalage de la RPS vers des longueurs d'onde plus petites s'explique d'une part par les dimensions des nanoparticules d'or mais pourrait également s'expliquer par une modification de l'état de surface des nanoparticules avec la présence du ligand présentant une propriété tensio-active. Lors de la prochaine étape qui est l'élaboration de nanoplastiques modèles marqués par encapsulation des nanoparticules d'or, si une seule nanoparticule d'or est introduite au cœur du nanoprécipité, ce nanoplastique pourrait ne pas être détecté par SP-ICP-MS. Il faudra donc s'assurer que chaque nanoprécipité contient au moins deux nanoparticules d'or. Enfin, en termes de concentration en nanoparticules, cet échantillon dans le THF est moins concentré que les dispersions aqueuses d'or alors que la quantité d'or engagée est beaucoup plus importante que celle engagée dans le protocole en phase aqueuse (12 fois plus). Cette différence est due à la présence d'agrégats éliminés lors de la filtration après synthèse qui représente environ 12% de la masse engagée d'or avant réaction (0,012 g).

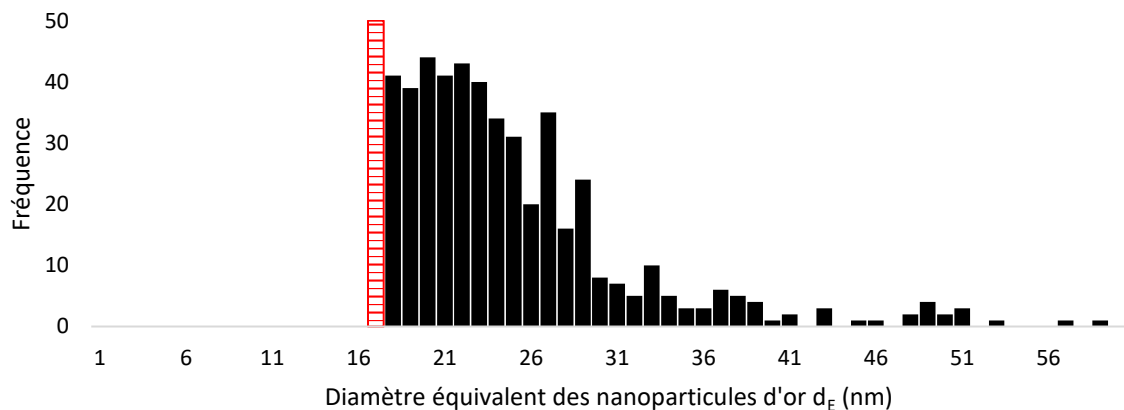


Figure 2. 12 : Distribution des tailles de l'échantillon Au<sub>THF</sub> analysé par SP-ICP-MS. Le trait rouge hachuré représente la LOD de la mesure

Les nanoparticules d'or synthétisées en phase organique ont été caractérisées en TEM après filtration (Figure 2. 13). Comparées aux dispersions aqueuses de nanoparticules d'or, ces nanoparticules en solvant organique semblent plus sphériques et ne présentent pas de morphologies polygonales. La dispersion semble également être constituée d'une population plutôt monodisperse.

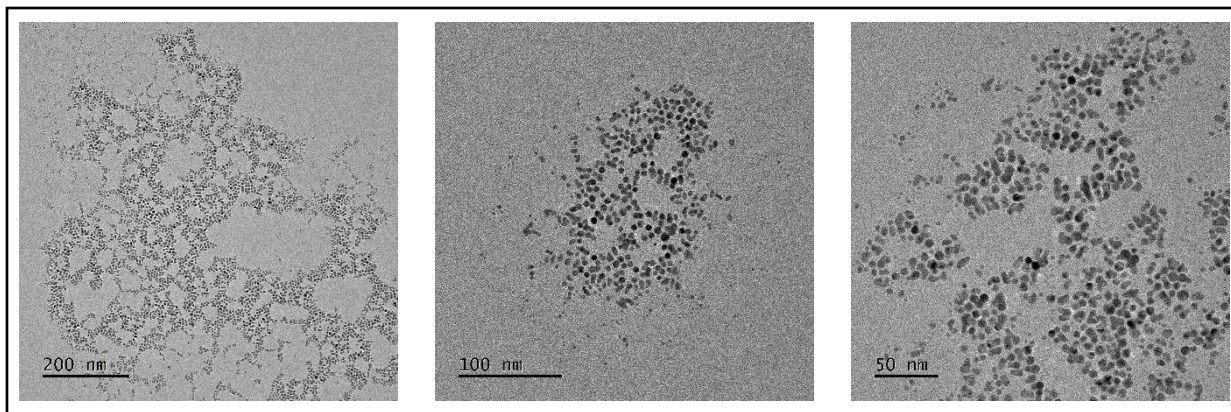
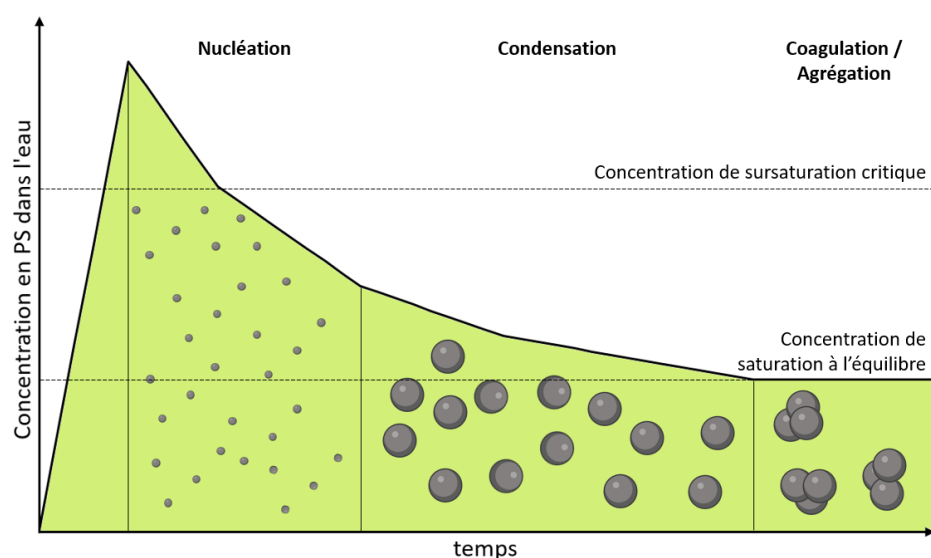


Figure 2. 13 : Images en TEM de Au<sub>THF</sub>

Les différentes dispersions de nanoparticules d'or qui joueront le rôle de traceur dans les nanoplastiques modèles marqués ont été synthétisées en phase aqueuse et organique puis caractérisées. Avant l'étape d'encapsulation, il a été nécessaire d'étudier et d'optimiser la technique de nanopréciptation, et cette étude a été réalisée sur du PS seul.

### 3.2. Optimisation de la nanopréciptation du PS

L'avantage principal de cette technique d'élaboration de nanoplastiques est qu'elle est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas l'ajout de tensio-actifs pour stabiliser la dispersion. Comme expliqué au Chapitre 1, l'absence de tensio-actifs dans une dispersion de nanoplastiques modèles est importante car ils peuvent induire une toxicité propre entraînant un biais de comportement dans les études d'(éco)-toxicité. La nanopréciptation est basée sur une réduction rapide de la solubilité par transfert d'une solution contenant les chaînes de polymère solubilisées dans un non-solvant miscible. Ici le solvant est le THF et le non-solvant est l'eau. Dès que la phase organique se diffuse dans l'eau, les chaînes de PS, d'abord solubles dans la phase organique, se retrouvent dans un milieu insoluble et entrent dans un état de sursaturation conduisant à leur nucléation dans tout le milieu (Figure 2. 14). Une nucléation homogène est assurée par la forte agitation du milieu pendant le procédé. À mesure que la nucléation se produit, la concentration en PS insoluble dans le non-solvant diminue, passant en dessous de la concentration critique de sursaturation. À ce stade, une étape de croissance des particules précurseurs se produit par condensation des chaînes de polymère solubilisées dans le milieu, jusqu'à atteindre la concentration de saturation à l'équilibre. Une dernière étape de croissance peut se produire par agglomération des particules précurseurs pour former les particules finales qui peuvent coaguler et sédimenter en cas d'instabilité de la dispersion (concentration en particules trop forte, tailles trop importantes, ...).


 Figure 2. 14 : Schéma de la formation de particules de PS par nanoprécipitation, adapté de Rivas *et al.*<sup>133</sup>

Ce procédé de nanoprécipitation est donc sensible à beaucoup de paramètres, dont les plus influents selon Zhao *et al.*<sup>145</sup> sont, la concentration en PS solubilisé en solvant organique, le ratio volumique de solvant / non-solvant (appelé  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  pour la suite de cette partie) et la vitesse d'introduction. Nous nous sommes attachés à optimiser ce procédé afin de produire des dispersions présentant des concentrations en nanoplastiques maximales. Cette pré-étude a été réalisée sur un PS commercial de masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de  $180\,000\text{ g mol}^{-1}$ . Le PS est solubilisé dans du THF avant d'être rapidement ajouté dans un milieu aqueux sous forte agitation pour assurer l'homogénéité des deux phases. Les particules sont purifiées par évaporation du solvant organique.

Le premier paramètre étudié a été la concentration en PS dans le THF, qui joue un rôle important dans le phénomène de sursaturation. En effet, à mesure que la concentration en PS augmente, pour un ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  constant, la concentration en PS insoluble dans l'eau augmente. Ainsi, une plus grande quantité de PS va s'accumuler sur les particules précurseurs et conduire à des tailles de particules plus grandes. Si la concentration en PS devient trop importante, deux cas de figures sont possibles (i) les particules formées ont des tailles trop grandes et vont coaguler et/ou sédimenter ou (ii) l'accumulation conduit à des particules stables mais nombreuses, qui vont s'agréger par agglomération. Dans l'étude de Zhao *et al.*<sup>145</sup>, la concentration maximale étudiée est de  $2,5\text{ g L}^{-1}$  avec  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}} = 1 : 9$ . Dans notre étude, à  $2,5\text{ g L}^{-1}$ , les particules sont stables et présentent un diamètre de  $205\text{ nm}$  et un PDI de  $0,11$ . Nous avons pu augmenter la concentration en PS jusqu'à  $10\text{ g L}^{-1}$  sans que la stabilité des particules soit compromise ( $d_H = 222\text{ nm}$  ; PDI =  $0,14$ ). Au-delà, des populations polydisperses sont obtenues avec la présence d'agrégats après filtration des dispersions.

Toujours dans une optique d'optimisation du procédé, l'influence du ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  a été étudiée, en fixant la concentration en PS à  $10 \text{ g L}^{-1}$  et le volume d'eau à 16 mL, les conditions et diamètres des particules obtenues sont reportés dans le Tableau 2. 9.

Tableau 2. 9 : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des dispersions obtenues par nanoprécipitation d'une solution de PS dans du THF à  $10 \text{ g L}^{-1}$  dans  $V_{\text{H}_2\text{O}} = 16 \text{ mL}$  en fonction du ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$ . Les diamètres ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants)

| <b>Ratio <math>V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}</math></b> | <b>1 : 9</b>                    | <b>1 : 8</b>                    | <b>1 : 6</b>                    | <b>1 : 4</b>                               |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| <b><math>m_{\text{PS}}</math> (mg)</b>                            | 18                              | 20                              | 27                              | 40   |
| <b>V après nanoprécipitation (mL)</b>                             | 16                              | 16                              | 16                              | 16   |
| <b>Observation</b>  | mélange laiteux, pas d'agrégats | mélange laiteux, pas d'agrégats | mélange laiteux, pas d'agrégats | mélange laiteux, présence d'agrégats (20%) |
| <b><math>d_H</math> (nm)</b>                                      | 222                             | 260                             | 308                             | 479  |
| <b>PDI</b>  | 0,14                            | 0,20                            | 0,16                            | 0,12                                       |

À volume d'eau constant (16 mL), le diamètre des particules de PS précipitées augmente avec la quantité de PS nanoprécipitée. Cette augmentation de taille s'explique par la condensation d'une plus grande quantité de chaînes de polymère en solution puis par une agrégation d'un plus grand nombre de particules, qui plus est, de plus grosses tailles, lors des deux étapes de croissance. À ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}} = 1 : 4$ , la quantité de PS est trop importante et conduit à la formation de particules qui ne sont plus stables et qui finissent par s'agréger et sédimenter. Le ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  peut ainsi être augmenté jusqu'à une valeur de 1 : 6 sans craindre la déstabilisation du procédé de nanoprécipitation.

Un ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  à 1 : 6 et une concentration en PS à  $10 \text{ g L}^{-1}$  sont fixés pour le reste de l'étude. Jusqu'à présent, le volume d'eau a été fixé à 16 mL. Pour évaluer les limites de ce protocole, les volumes engagés ont été multipliés par 2 pour atteindre  $V_{\text{THF}} = 5,3 \text{ mL}$  et  $V_{\text{H}_2\text{O}} = 32 \text{ mL}$ . À de tels volumes, la quantité de THF à évaporer en fin de protocole est plus importante et une adaptation de l'étape d'évaporation a été nécessaire. Le bullage à l'azote a été remplacé par un passage à l'évaporateur rotatif ( $40^\circ\text{C}$ , 357 mbar, 20 min). Afin de vérifier que ce changement de protocole d'évaporation du THF n'affecte pas les dispersions, les diamètres obtenus sur un échantillon après évaporation par bullage à l'azote et sur un échantillon après évaporation à l'évaporateur rotatif ont été comparés (Tableau 2. 10).

Tableau 2. 10 : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des dispersions obtenues par nanopréciipitation en fonction du mode d'évaporation du THF à un ratio  $V_{THF} / V_{H_2O} = 1 : 6$  d'une solution de PS dans du THF à  $10 \text{ g L}^{-1}$  dans  $V_{H_2O} = 32 \text{ mL}$ . Les diamètres ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants)

| Mode d'évaporation | Bullage à l'azote | Evaporateur rotatif |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| $d_H$ (nm)         | 172               | 199                 |
| PDI                | 0,14              | 0,16                |

En fonction du mode d'évaporation, une légère différence en termes de diamètre des particules nanopréciipitées est observée. Alors que pour la méthode classique d'évaporation (bullage à l'azote), des particules de diamètre moyen de 172 nm sont obtenues, ce diamètre passe à 199 nm pour l'évaporation *via* l'évaporateur rotatif. Cette modification de diamètre n'est pas critique et l'évaporation à l'évaporateur rotatif plus rapide (20 min) que l'évaporation par bullage à l'azote (90 min) peut être adoptée. Il est également intéressant de comparer les résultats sur des volumes engagés différents mais purifiés tous deux par bullage à l'azote. En augmentant les volumes d'eau de 16 à 32 mL à ratio  $V_{THF} / V_{H_2O}$  constant (1 : 6), la taille des nanoplastiques diminue. En effet, pour un volume d'eau de 16 mL (Tableau 2. 9) le diamètre des particules obtenues est de 308 nm quand pour un volume d'eau de 32 mL (Tableau 2. 10) ce diamètre est de 172 nm. Plusieurs pistes peuvent expliquer cette différence. Tout d'abord, sur des volumes engagés plus important, le volume de diffusion est plus important ce qui entraîne la formation d'un nombre plus important de particules précurseurs lors de l'étape de nucléation. Ensuite, la vitesse d'agitation entre ces deux échantillons, n'est pas strictement la même étant donné que pour les plus grands volumes, un changement de ballon et de barreau aimanté a été réalisé. Dans leur étude, Zhao *et al.*<sup>145</sup> ont montré une dépendance du diamètre des particules avec la vitesse d'agitation dans le non-solvant, une vitesse plus importante augmente la turbulence dans le non-solvant, ce qui augmente la vitesse de diffusion du solvant et engendre la nucléation d'un plus grand nombre de particules précurseurs.

Pour conclure sur l'augmentation des volumes engagés, il a été montré que cette technique peut permettre d'obtenir un plus grand volume de nanoplastiques modèles de diamètres inférieurs. En effet, la méthode de nanopréciipitation ( $C_{PS} = 10 \text{ g L}^{-1}$  et ratio  $V_{THF} / V_{H_2O} = 1 : 6$ ) réalisée sur un volume d'eau de 16 mL conduit à des particules purifiées par bullage à l'azote de diamètre  $d_H = 308 \text{ nm}$  tandis que doubler le volume d'eau tout en gardant les autres paramètres constants permet de réduire le diamètre des particules à  $d_H = 199 \text{ nm}$  et purifiées à l'évaporateur rotatif.

Le quatrième paramètre étudié est la vitesse d'introduction du PS dans le non-solvant. Ce paramètre influence la taille finale des particules car l'augmentation de la vitesse d'ajout du PS dans le non-solvant

a pour conséquence d'augmenter la quantité de PS introduite à un temps donné et donc d'engendrer un taux de nucléation élevé réduisant ainsi fortement le diamètre moyen des particules après les étapes de croissance<sup>150</sup>. Pour cette expérience, la concentration en PS est de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , le ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  1 : 8 et le volume d'eau est de 16 mL. Trois débits ont été étudiés :  $2 \text{ mL s}^{-1}$ ,  $1 \text{ mL s}^{-1}$  et au goutte-à-goutte. Alors que le PDI diminue à mesure que le débit diminue, la taille ne suit pas une évolution linéaire. Au goutte-à-goutte, les particules de PS ont une taille moyenne de 329 nm, à  $1 \text{ mL s}^{-1}$  le diamètre moyen passe à 245 nm puis réaugmente à 260 nm pour une vitesse d'introduction de  $2 \text{ mL s}^{-1}$ . Cette évolution ne suit pas la tendance montrée par Zhao *et al.*<sup>145</sup> puisque dans leur étude, après une légère augmentation du diamètre entre 0,02 et 0,1  $\text{mL s}^{-1}$ , le diamètre diminue ensuite avec l'augmentation de la vitesse d'introduction. Par rapport à ces résultats, la vitesse d'introduction a été fixée à  $2 \text{ mL s}^{-1}$  pour la suite de ces travaux.

Finalement, le protocole de nanopréciipitation a été optimisé dans une optique d'obtenir des nanoplastiques modèles. Pour obtenir des dispersions satisfaisantes en termes de taille des particules, de polydispersité et de stabilité, la concentration en PS a été fixée à  $10 \text{ g L}^{-1}$ , le ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  à 1 : 6, le volume d'eau à 16 mL et la vitesse d'introduction à  $2 \text{ mL s}^{-1}$ . Ces paramètres permettent d'obtenir des dispersions de nanoplastiques d'une taille de 308 nm (PDI = 0,16). Pour diminuer ce diamètre, il est possible d'augmenter le volume d'eau en gardant tous les autres paramètres constants : le doublement du volume d'eau engendre une diminution du diamètre moyen à 199 nm (PDI = 0,16).

Le but ces travaux étant de réaliser des nanoplastiques modèles marqués, la faisabilité de la nanopréciipitation sur différents polymères de type PS a été étudiée afin d'avoir plusieurs modèles disponibles. Les PS étudiés sont : le PS commercial précédemment cité et 3 PS synthétisés au laboratoire (PS-AIBN, PS18AA et PS18VBA). Le PS-AIBN est un homopolymère de PS synthétisé par polymérisation en masse amorcée par de l'AIBN, le PS18AA est un copolymère de PS et de poly(acide acrylique) (PAA) synthétisé par émulsion sans tensio-actif avec  $[\text{AA}]/[\text{AA}+\text{styrène}] = 0,18$  et PS18VBA est un copolymère de PS et de poly(acide 4-vinylbenzoïque) (PVBA) synthétisé par émulsion sans tensio-actif avec  $[\text{VBA}]/[\text{VBA}+\text{styrène}] = 0,18$ . La masse molaire et les dispersités ( $\text{Đ}$ ) de chacun de ces polymères ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES) et les résultats des nanopréciipitations, en termes de diamètre et de polydispersité (PDI), sont présentés dans le Tableau 2. 11.

Tableau 2. 11 : Etude de la faisabilité de la nanopréciptation sur des PS de différentes natures dans les conditions suivantes : concentration en PS de 10 g L<sup>-1</sup>, ratio V<sub>THF</sub> / V<sub>H2O</sub> 1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de 2 mL s<sup>-1</sup>. Les masses molaire moyennes (M<sub>n</sub>) et les dispersités (Đ) ont été déterminées par CES et les diamètres (d<sub>H</sub>) et les polydispersités (PDI) par DLS (algorithme des cumulants)

| Nature du PS                          | PS-commercial | PS-AIBN    | PS18AA     | PS18VBA    |
|---------------------------------------|---------------|------------|------------|------------|
| M <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> ) | 180 000       | 550 000    | 218 600    | 31 200     |
| Đ                                     | 1,5           | 1,4        | 2,5        | 3,9        |
| d <sub>H</sub> (nm) ; PDI             | 308 ; 0,16    | 188 ; 0,20 | 185 ; 0,18 | 195 ; 0,23 |

Une dépendance de la taille et du PDI en fonction de la nature du PS est observée. Alors que pour le PS commercial, les tailles des nanoplastiques obtenus sont de l'ordre de 308 nm, pour les 3 polymères synthétisés en laboratoire, les tailles sont équivalentes et se situent autour de 185 – 195 nm. Concernant les deux homopolymères (PS commercial et PS-AIBN), les différentes valeurs de masses molaires peuvent être discutées. Alors qu'une augmentation du diamètre des particules nanopréciptées avec la masse molaire du polymère engagé est attendue<sup>151</sup>, ce n'est pas le cas dans notre étude. En effet le PS-AIBN qui présente une masse molaire plus grande conduit à des particules de diamètre moyen plus petit (188 contre 308 nm). Ce résultat peut s'expliquer par la nature des bouts de chaînes issus de l'amorceur qui favoriseraient la solubilité de ce polymère. Si la solubilité est améliorée, la concentration de saturation est plus faible et donc les particules obtenues sont plus petites, pourtant les masses molaires sont très élevées pour observer une telle influence des extrémités de chaînes. Pour les copolymères fonctionnalisés (PS18AA et PS18VBA), la présence de fonctions carboxyliques le long des chaînes de polymère améliore la solubilité et donc la stabilité des particules précurseurs lors de l'étape de nucléation. Lorsque la stabilité des particules précurseurs est meilleure, plus de particules précurseurs sont formées.

La méthode de nanopréciptation a donc été optimisée et est réalisable sur plusieurs polymères de type PS présentant des fonctionnalités et des masses molaires différentes. Pour permettre l'obtention de particules de tailles comprises entre 200 et 400 nm, les paramètres suivants ont été retenus :

- une concentration maximale en PS de 10 g L<sup>-1</sup>
- un ratio V<sub>THF</sub> / V<sub>H2O</sub> 1 : 6
- un volume d'eau de 16 mL
- une vitesse d'introduction du solvant dans le non-solvant de 2 mL min<sup>-1</sup>.

La faisabilité d'encapsuler les nanoparticules d'or précédemment synthétisées lors de la nanopréciptation du PS fait l'objet de la suite de ce chapitre.

### 3.3. Marquage des particules de PS

Après avoir synthétisé les traceurs que sont les nanoparticules d'or ainsi qu'optimisé les conditions de la nanoprécipitation du PS dans de l'eau, le développement de modèles de nanoplastiques marqués métalliquement a été étudié. Afin de s'affranchir des problèmes de désorption du marqueur rencontrés avec les traceurs de nature ionique, les traceurs particuliers sont ici introduits par encapsulation dans les chaînes de polymère. Pour cela, deux stratégies, décrites dans la Figure 2. 7, ont été étudiées. La première stratégie est la co-nanoprécipitation dans de l'eau du PS mis en solution dans du THF contenant les nanoparticules d'or. Dans la seconde stratégie, du PS solubilisé dans du THF est nanoprécipité dans de l'eau contenant les nanoparticules d'or.

#### 3.3.1. Co-nanoprécipitation de PS et de nanoparticules d'or dans de l'eau

La co-nanoprécipitation dans de l'eau du PS mis en solution dans du THF contenant les nanoparticules d'or a été testée sur les 4 PS étudiés lors de l'optimisation de la nanoprécipitation présentée ci-dessus. Pour rappel, en absence d'or tous ces polymères nanoprécipitent et conduisent à des particules monodisperses.

En présence d'or, seuls les PS fonctionnalisés en surface par des fonctions carboxyliques (PS18AA et PS18VBA) ont conduit à des dispersions sans présence d'agrégats. Pour les PS non fonctionnalisés (PS commercial et PS-AIBN), la co-nanoprécipitation a conduit à l'obtention de dispersions de couleur violette avec de gros agrégats blancs de PS. Les agrégats représentaient jusqu'à la totalité du PS engagé dans la nanoprécipitation et de fait, aucune particule de PS n'a été retrouvée dans le filtrat lors des analyses de DLS. Notre étude s'est alors concentrée sur les PS18AA et PS18VBA.

Dans un premier temps, l'influence sur le procédé de nanoprécipitation de différents ratios massiques d'or sur PS (ratio Au/PS) a été étudiée en utilisant le PS18AA (Tableau 2. 12). Ces nanoprécipitations ont été réalisées à une vitesse d'introduction de  $2 \text{ mL s}^{-1}$ , un volume d'eau de 16 mL et avec le ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}} = 1 : 6$ , soit les valeurs optimisées dans la précédente partie. Pour ces expériences, nous avons travaillé avec des ratio Au/PS à quantité de PS constante (PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69) et des ratios Au/PS à quantité d'or constante (PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_2,04 et PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_10,25) afin de les comparer. La concentration en PS dans le THF varie donc entre 3,7 et 0,37 g L<sup>-1</sup>.

Tableau 2. 12 : Caractérisation en diamètre ( $d_H$ ) des nanoprécipitations de PS18AA dans de l'eau et des co-nanoprécipitations d'or et de PS18AA dans de l'eau en fonction des ratios Au/PS, dans les conditions de nanoprécipitation suivantes : ratio  $V_{THF} / V_{H_2O}$  1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de  $2 \text{ mL s}^{-1}$ . Les diamètres ( $d_H$ ) ont été mesurés par DLS (algorithme des cumulants et SBL). Pour les diamètres mesurés par DLS avec l'algorithme SBL les proportions de chaque population retrouvée sont données entre parenthèses

| Echantillon                     | m Au<br>(mg) | m PS<br>(mg) | ratio Au/PS<br>( $w/w$ ) | Diamètre                 |                  |                  |                  |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                 |              |              |                          | cumulants<br>$d_H$ ; PDI | SBL $d_{H1}$ (%) | SBL $d_{H2}$ (%) | SBL $d_{H3}$ (%) |
| PS18AA_10                       | 0            | 10,0         | 0                        | 187 ; 0,08               | 198 (100%)       | -                | -                |
| PS18AA_5                        | 0            | 5,0          | 0                        | 185 ; 0,10               | 188 (100%)       | -                | -                |
| PS18AA_1                        | 0            | 1,0          | 0                        | 199 ; 0,10               | 195 (100%)       | -                | -                |
| PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,55  | 5,5          | 10,0         | 0,55                     | 177 ; 0,22               | 198 (68%)        | 1033 (17%)       | 63 (15%)         |
| PS18AA_Au <sub>THF</sub> _0,69  | 6,9          | 10,0         | 0,69                     | 175 ; 0,25               | 103 (50%)        | 446 (50%)        | -                |
| PS18AA_Au <sub>THF</sub> _2,04  | 10,2         | 5,0          | 2,04                     | 172 ; 0,14               | 153 (68%)        | 313 (32%)        | -                |
| PS18AA_Au <sub>THF</sub> _10,25 | 10,2         | 1,0          | 10,20                    | 196 ; 0,16               | 176 (71%)        | 327 (29%)        | -                |

Les caractérisations en termes de diamètres obtenus sur ces nanoprécipitations sont assez proches. Tout d'abord, en faisant varier la masse de PS, aucune différence significative n'est observée (de 185 à 199 nm, algorithme des cumulants). Entre les nanoprécipitations en présence et en absence d'or, à quantités de PS constantes, une légère diminution de la taille est observée sur les modèles marqués. Le PDI augmente également légèrement. Les diamètres mesurés avec l'algorithme SBL sont reportés dans le Tableau 2. 12. Ces valeurs mettent en évidence la présence de plusieurs populations de particules nanoprécipitées uniquement quand la nanoprécipitation a lieu en présence d'or. Les valeurs de ces diamètres déterminées par SBL encadrent globalement la valeur déterminée par l'algorithme des cumulants, sauf pour l'échantillon PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 dans lequel une très grande population (1033 nm) et une très petite population (63 nm) sont analysées. Ces résultats permettent donc de montrer que la présence d'or exerce une influence sur la nanoprécipitation avec l'apparition de plusieurs populations de particules, mais ne confirment pas l'encapsulation de l'or au sein des particules de PS. Ainsi, afin de visualiser la morphologie des modèles et de vérifier l'encapsulation de l'or par les nanoplastiques, les échantillons ont été analysés en TEM, les images sont reportées dans la Figure 2. 15.

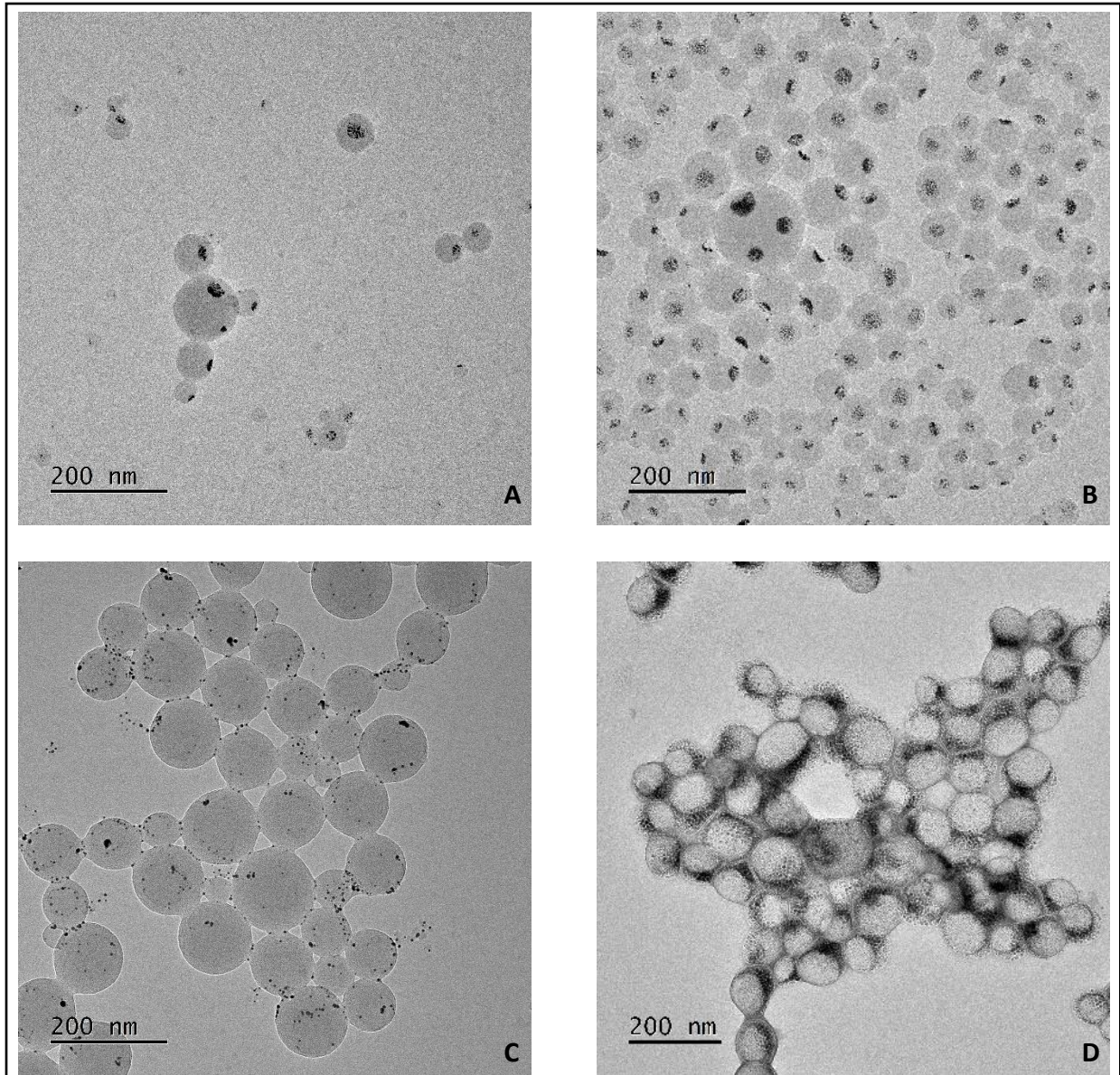


Figure 2. 15 : Images en TEM de A) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 ; B) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69 ; C) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_2,04 et D) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_10,25

Ces images en TEM (Figure 2. 15) permettent de visualiser les particules de PS ainsi que les nanoparticules d'or qui sont de couleur plus foncée. Pour les deux premiers échantillons (PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69), tout l'or est dans ou sur les particules de PS. Avec ces images, il n'est pas possible de déterminer si le traceur se situe à l'intérieur et/ou en surface des nanoplastiques. Pour les échantillons contenant un ratio Au/PS supérieur à 2 (PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_2,04 et PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_10,25), des nanoparticules d'or apparaissent « libres », soit, ni ad- ou absorbées aux nanoplastiques, observation d'autant plus frappante pour l'échantillon PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_10,25. Ces deux échantillons ont donc été laissés de côté et la suite des caractérisations s'est focalisée sur les deux plus faibles ratios.

En absence d'or et dans les mêmes conditions, la nanopréciipitation conduit à des particules ayant des diamètres de l'ordre de 187 nm. Les résultats de DLS montrent que la présence d'or conduit à des nanoplastiques légèrement plus petits mais dans le même ordre de grandeur (176 nm). La mesure de la taille a également été réalisée par analyse des images de TEM, à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont présentés dans la Figure 2. 16.

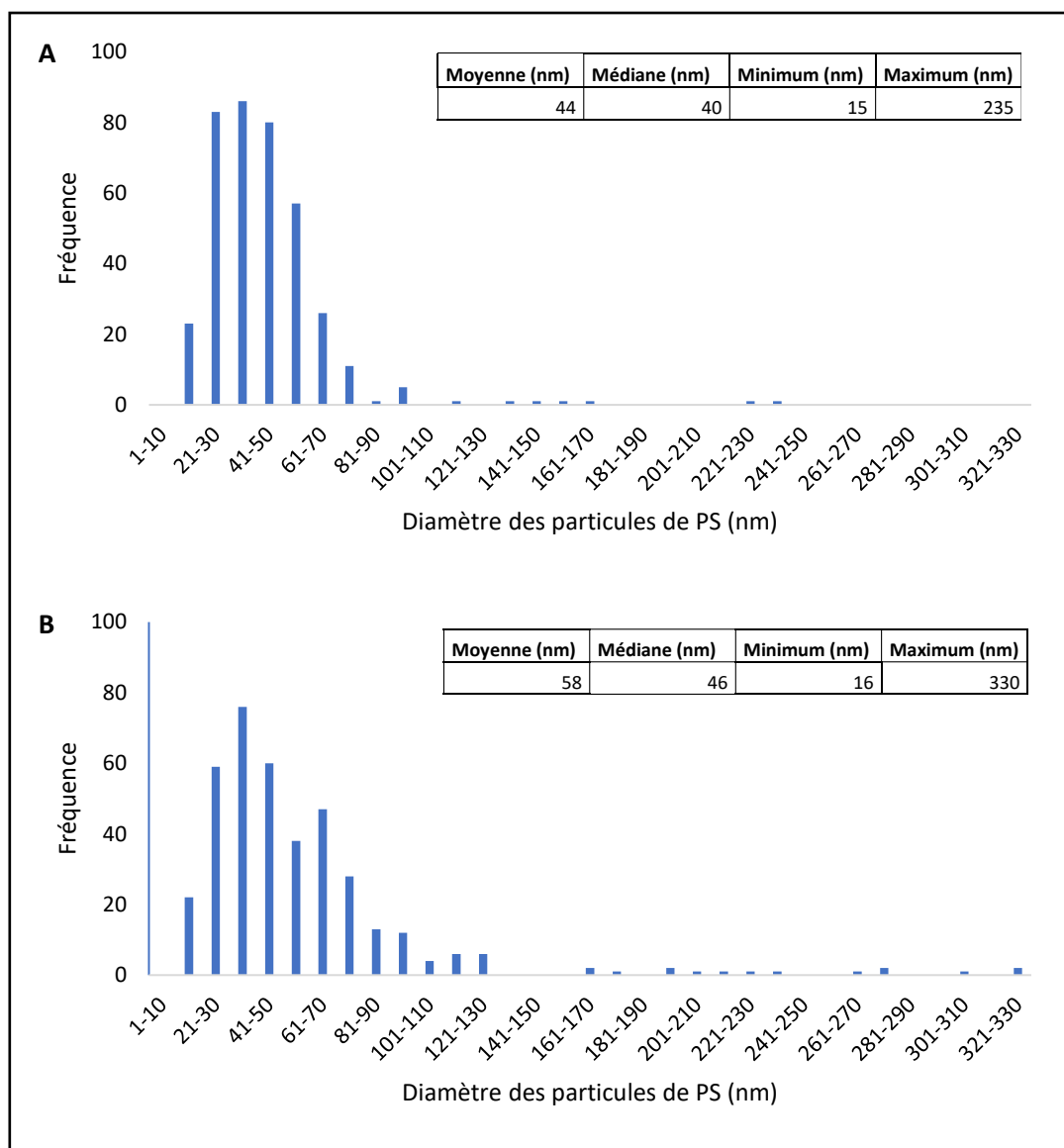


Figure 2. 16 : Distribution en nombre de la taille des particules de PS dans les échantillons A) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et B) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69. A : les résultats sont issus de 379 mesures sur 37 images de TEM et B : les résultats sont issus de 386 mesures sur 30 images de TEM

Par analyse des images de TEM, les tailles médianes des nanoplastiques modèles marqués sont de 40 nm pour l'échantillon PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et de 46 nm pour l'échantillon PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69. Ces valeurs sont très inférieures à celles déterminées par DLS (Tableau 2. 12). En DLS, une population d'un diamètre moyen de 63 nm qui représente 15% de toutes les particules a été détectée dans l'échantillon

PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55, cette valeur se rapproche ainsi de celle déterminée par analyse des images de TEM (46 nm). Dans l'échantillon PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69, aucune population inférieure à 100 nm n'a été détectée en DLS. Ces résultats de DLS peuvent s'expliquer par le phénomène reposant sur la mesure. Les analyses de DLS s'appuient sur la mesure des coefficients de diffusion des particules rencontrées par le laser lorsque celui-ci traverse la dispersion. Le diamètre hydrodynamique est ensuite calculé grâce à l'équation de Stokes-Einstein dans laquelle le diamètre est inversement proportionnel au coefficient de diffusion. Mais dans une dispersion polydisperse, la probabilité que le laser rencontre une grande particule plutôt qu'une petite particule est beaucoup plus élevée. Ce qui explique qu'en dispersion polydisperse, les particules de plus grande taille sont déterminantes dans la mesure des diamètres. En TEM (Figure 2. 16) quelques particules de diamètres supérieurs à 100 nm sont également retrouvées, avec des maximums à 235 et 330 nm. Ces particules correspondent ainsi aux populations détectées par DLS, mais ont été mesurées dans une moins grande proportion en TEM. Bien que la distribution en taille des particules ait été réalisée sur un grand nombre de particules (380) et sur une trentaine d'images, ces analyses en TEM ne sont pas représentatives de l'entièreté de l'échantillon, puisque seulement quelques zones du dépôt de particules ont été analysées.

La combinaison des analyses de diamètre par DLS et par analyse d'images de TEM a ainsi permis de mettre en évidence la présence de plusieurs populations de particules avec des tailles allant d'une quinzaine de nanomètre à plusieurs centaines. Ces modèles de nanoplastiques sont polydisperses ce qui présente l'avantage de se rapprocher des dispersités de diamètres des nanoplastiques environnementaux. Par ailleurs, il est toujours possible de séparer ces modèles en fonction du diamètre si nécessaire, par fractionnement par couplage flux – force à flux croisés (AF4) par exemple<sup>152</sup>.

Face à une polydispersité importante, il est maintenant important de déterminer les diamètres des amas de nanoparticules d'or associés aux particules de PS. En effet, comme reporté précédemment dans la Figure 2. 10, en fonction des tailles des nanoplastiques et des nanoparticules d'or constituant les nanoplastiques modèles, la densité des modèles peut largement dépasser la densité d'un PS qui est de 1,04. Par exemple, un amas de nanoparticules d'or ayant un diamètre équivalent de 50 nm dans une particule de PS de 100 nm donnerait un modèle marqué d'une densité de 3,07. Pour mesurer le diamètre équivalent des amas de nanoparticules d'or qui marquent les nanoplastiques, la technique de la SP-ICP-MS a été utilisée.

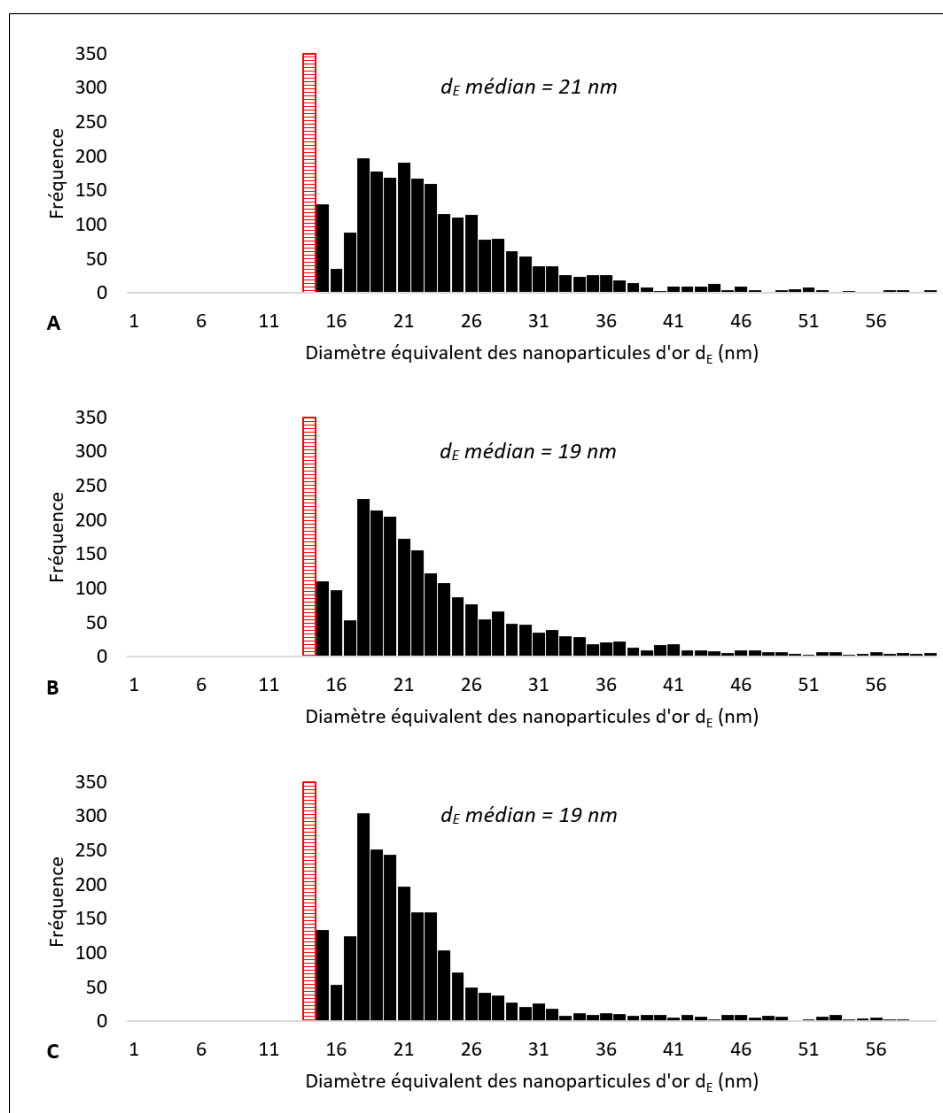


Figure 2. 17 : Distribution des tailles analysées par SP-ICP-MS de A) Au<sub>THF</sub>, B) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et C) PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69. Les traits rouges hachurés représentent les LOD des mesures

L'analyse de la dispersion d'or seule a été comparée à celles des échantillons PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,55 et PS18AA\_Au<sub>THF</sub>\_0,69 et les résultats sont reportés dans la Figure 2. 17. Il n'est pas observé d'évolution franche de la taille des nanoparticules d'or. Alors qu'avant co-nanoprécipitation avec le PS, les nanoparticules d'or ont un diamètre de 21 nm, celui-ci diminue à 19 nm après co-nanoprécipitation, ce qui n'est pas significatif. Ces résultats indiquent donc qu'une seule nanoparticule d'or est encapsulée dans les nanoplastiques modèles. Il est cependant important de remarquer que les distributions ne semblent pas complètes à cause de tailles mesurées très proche de la LOD de la méthode analytique (traits rouge hachurés sur la Figure 2. 17). Les diamètres moyens pourraient être légèrement inférieurs à 19 et 20 nm, des distributions de tailles des nanoparticules d'or comprises entre 10 et 50 nm peuvent ainsi être considérées. À partir des résultats expérimentaux des diamètres des nanoplastiques marqués (déterminés par DLS, Tableau 2. 12, et images de TEM, Figure 2. 16) et des diamètres des

nanoparticules d'or (déterminés par SP-ICP-MS, Figure 2. 17), la Figure 2. 10 a pu être retravaillée. Les diamètres des nanoparticules d'or ont été centrés sur des valeurs comprises entre 10 et 50 nm, et les tailles des particules de PS permettant l'obtention de modèles avec une densité jusqu'à 10% supérieure à la densité du PS ont été déterminées (Figure 2. 18).

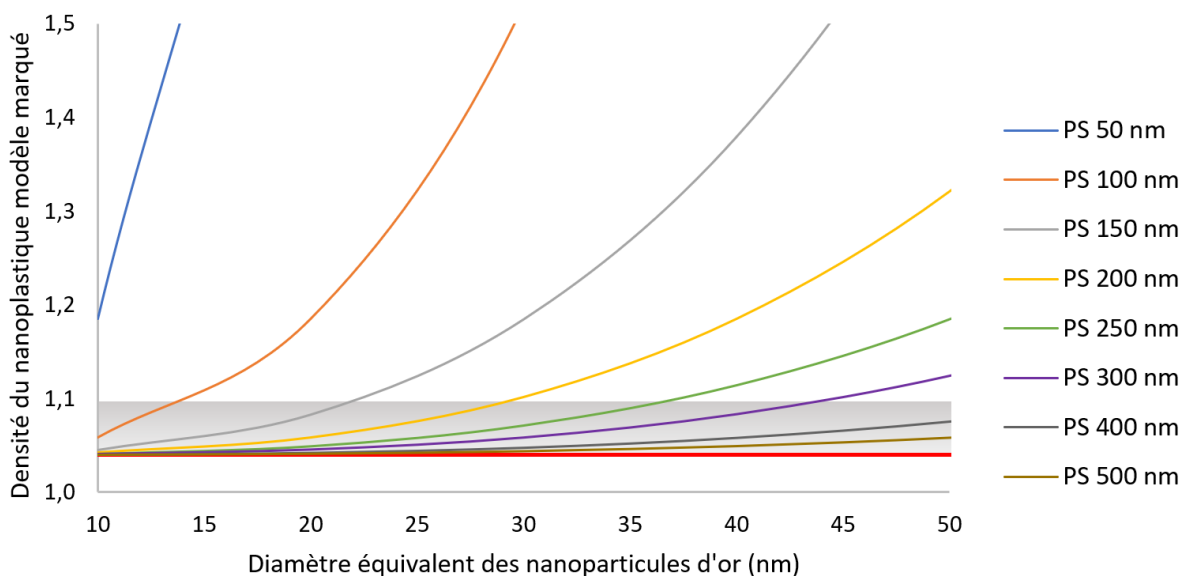


Figure 2. 18 : Evolution théorique de la densité des nanoplastiques modèles marqués en fonction du diamètre des nanoparticules d'or compris entre 10 et 50 nm utilisées comme traceurs pour des particules de PS de diamètre 50 nm (courbe bleue), 100 nm (courbe orange), 150 nm (courbe grise), 200 nm (courbe jaune), 250 nm (courbe verte), 300 nm (courbe violette), 400 nm (courbe gris foncé) et 500 nm (courbe marron). La zone grisée correspond à une densité de modèles comprise entre 1,04 et 1,14

Avec les nanoparticules d'or synthétisées de tailles comprises entre 10 et 50 nm, des nanoplastiques de tailles supérieures à 400 nm sont utilisables pour avoir une densité finale de modèle inférieure à 1,14. Pour des PS de 300 nm, les nanoparticules d'or doivent être inférieures à 44 nm, pour des PS de 250 nm, les marqueurs doivent être inférieurs à 37 nm, pour des PS de 200 nm, c'est 30 nm et pour des PS de 150 nm, c'est 22 nm. Nos particules de PS les plus petites ont des diamètres compris entre 50 et 100 nm. Pour ne pas augmenter la densité du modèle de plus de 10%, les nanoparticules d'or doivent avoir des diamètres respectivement inférieurs à 14 et 8 nm, soit des valeurs inférieures à la LOD de l'instrument analytique. Deux possibilités seraient sans doute envisageables pour obtenir des modèles de nanoplastiques marqués avec une densité acceptable et détectables par SP-ICP-MS, (i) séparer les nanoplastiques par AF4 et (ii) séparer les nanoplastiques par l'application d'une force centrifuge (centrifugation). Cette séparation n'a pas été étudiée et pourrait faire l'objet de travaux futurs.

Jusqu'à présent, la position relative du marqueur par rapport au nanoplastique n'a toujours pas pu être déterminée. En effet, les images de TEM ne permettent pas d'affirmer que le traceur se situe à l'intérieur ou en surface des nanoplastiques. L'adsorption en surface pourrait avoir lieu pendant la

nanoprécipitation ou pendant la préparation de l'échantillon pour l'analyse en TEM, avec une affinité de l'or à s'agréger autour des PS lors du dépôt de l'échantillon sur la grille d'analyse. Pour essayer de déterminer si les nanoparticules d'or sont en surface ou au cœur des nanoplastiques, un échantillon d'or et un échantillon de PS ont été nanoprécipités séparément dans de l'eau puis ces deux nanoprécipitats ont été mélangés à un ratio Au/PS = 1,1. Le mélange résultant a ensuite été caractérisé en TEM (Figure 2. 19).

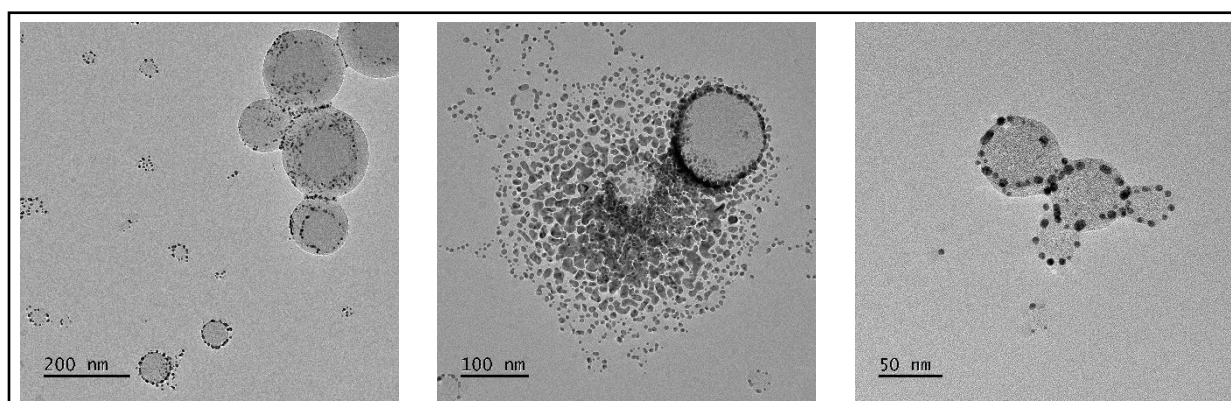


Figure 2. 19 : Images en TEM d'un mélange d'or et de PS nanoprécipités séparément

Les images de cette expérience diffèrent des précédentes (Figure 2. 15A et B), les nanoparticules d'or libres sont plus présentes et celles qui sont à proximité des nanoplastiques forment une couronne. Ces résultats qualitatifs montrent que les nanoprécipitations effectuées pour l'encapsulation de nanoparticules d'or ci-dessus et reportées Figure 2. 15 semblent être un phénomène différenciable du simple mélange de PS nanoprécipités et d'or nanoprécipités. Cependant, cette étude ne permet toujours pas de déterminer si le traceur se situe à l'intérieur ou à la surface des nanoplastiques modèles.

Une autre série de nanoplastiques marqués a été synthétisée à partir du PS18VBA en utilisant les mêmes conditions de nanoprécipitation que pour le PS18AA. Les ratios massiques Au/PS ont été choisis inférieurs au ratio critique de 2 qui a été déterminé avec le PS18AA (Tableau 2. 13).

Tableau 2. 13 : Co-nanoprécipitation d'or et de PS18VBA dans de l'eau : ratios étudiés dans les conditions de nanoprécipitation suivantes : ratio  $V_{\text{THF}} / V_{\text{H}_2\text{O}}$  1 : 6, volume d'eau de 16 mL et vitesse d'introduction de 2 mL s<sup>-1</sup>

| Echantillon                     | m Au (mg) | m PS (mg) | ratio Au/PS (w/w) |
|---------------------------------|-----------|-----------|-------------------|
| PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,25 | 2,45      | 10,0      | 0,25              |
| PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,48 | 4,8       | 10,0      | 0,48              |
| PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _0,73 | 3,6       | 5,0       | 0,73              |
| PS18VBA_Au <sub>THF</sub> _1,21 | 7,3       | 6,0       | 1,21              |

Ces échantillons ont été analysés en SEM en utilisant plusieurs modes d'analyse du détecteur (DF1 : Dark-Field 1 et HAADF : High-Angle Annular Dark-Field) et les images sont reportées dans la Figure 2. 20. En alternant le mode DF1 et HAADF, les clichés mettent en évidence des nanoparticules d'or non visibles avec le premier mode et vice-versa. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de nanoparticules d'or à différentes profondeurs du nanoplastique et donc pourrait traduire le fait que l'or est bien au cœur du nanoplastique. Contrairement à ce qui a été observé avec le PS18AA, les nanoparticules d'or restent majoritairement individualisées. Par ailleurs, aucune nanoparticule d'or libre ne semble être présente. Ces échantillons ont pour le moment été uniquement caractérisés en SEM et il n'y a pas assez de clichés pour envisager un comptage et une caractérisation en taille suffisamment pertinents. Ces échantillons pourraient donc être étudiés plus finement avec notamment des analyses par SP-ICP-MS pour déterminer les diamètres équivalents des nanoparticules d'or et également comparer les caractéristiques physiques en fonction du ratio Au/PS.

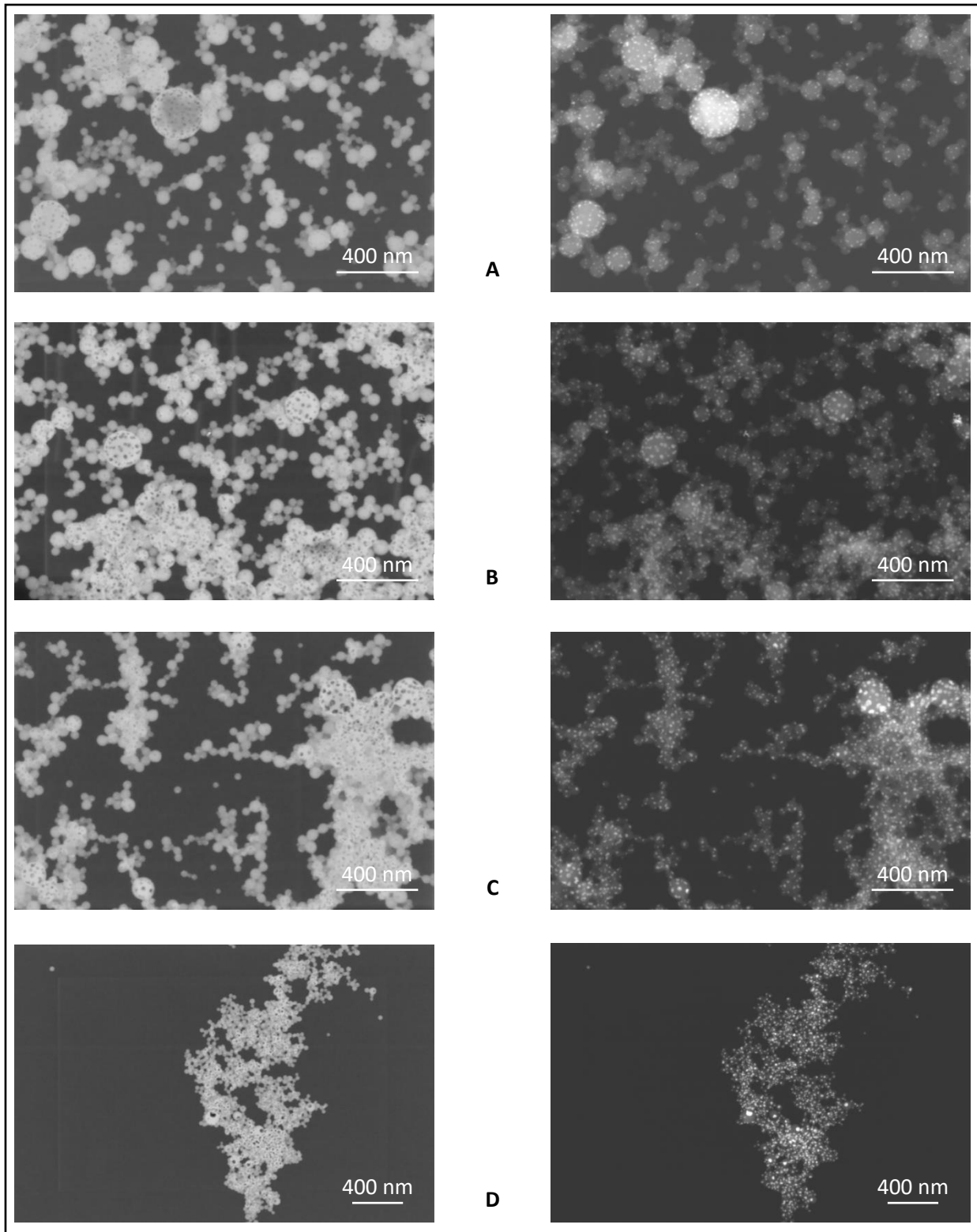


Figure 2. 20 : Images en SEM de A) PS18VBA\_Au<sub>THF</sub>\_0,25 ; B) PS18VBA\_Au<sub>THF</sub>\_0,48 ; C) PS18VBA\_Au<sub>THF</sub>\_0,73 et D) PS18VBA\_Au<sub>THF</sub>\_1,21. Les images de gauche ont été analysées en mode d'analyse Darf-Field (DF), les images de droite en mode d'analyse High-Angle Annular Dark-Field (HAADF)

### 3.3.2. Nanoprécipitation de PS dans une dispersion aqueuse de nanoparticules d'or

La seconde stratégie de synthèse de nanoplastiques modèles marqués avec des nanoparticules d'or est la nanoprécipitation de PS solubilisé dans du THF dans une dispersion aqueuse de nanoparticules d'or. Cette stratégie a été testée sur les dispersions aqueuses d'or Au<sub>H2O</sub>0,9 ; Au<sub>H2O</sub>1,1 et Au<sub>H2O</sub>1,4. Le PS utilisé est le PS18VBA qui a été nanoprécipité dans les dispersions aqueuses d'or à différents ratio Au/PS : 0,03 ; 0,33 ; 0,83 et 1,66. Le nom des échantillons est décrit dans le Tableau 2. 14.

Tableau 2. 14 : Nom des échantillons des dispersions de PS nanoprécipitées dans des dispersions aqueuses de nanoparticules d'or. Les noms des échantillons en italique et de couleur bleue correspondent aux échantillons caractérisés en TEM

| <b>Ratio Au/PS :</b>        | <b>0,03</b>                             | <b>0,33</b>                        | <b>0,83</b>                        | <b>1,66</b>                             |
|-----------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|---|
| <b>Au<sub>H2O</sub> 0,9</b> | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>0,9_0,03</i> | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 0,9_0,33 | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 0,9_0,83 | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>0,9_1,66</i> |
| <b>Au<sub>H2O</sub> 1,1</b> | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>1,1_0,03</i> | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,1_0,33 | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,1_0,83 | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>1,1_1,66</i> |
| <b>Au<sub>H2O</sub> 1,4</b> | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>1,4_0,03</i> | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,4_0,33 | PS18VBA_Au <sub>H2O</sub> 1,4_0,83 | <i>PS18VBA_Au<sub>H2O</sub>1,4_1,66</i> |

Parmi ces échantillons, ceux avec les ratio Au/PS les plus faibles (0,03) et les plus élevés (1,66) ont été caractérisés en TEM (Figure 2. 21). Les images montrent un mélange plutôt qu'une association entre nanoparticules d'or et nanoplastiques. Ces échantillons présentent en effet très peu de nanoparticules d'or et elles sont en dehors des nanoplastiques modèles. Une possible répulsion entre les nanoplastiques chargés négativement et les nanoparticules d'or synthétisées par réduction au citrate de sodium, composé également chargé négativement, pourrait expliquer l'échec de cette stratégie. Ainsi pour pouvoir incorporer ces nanoparticules d'or dans les nanoplastiques par nanoprécipitation, la modification de la charge de surface des traceurs, par exemple en y déposant une couche chargée positivement pourrait constituer une perspective intéressante. À la vue de ces résultats, aucune caractérisation supplémentaire n'a été entreprise sur ces échantillons, ni sur les échantillons au ratio Au/PS intermédiaire (0,33 et 0,83).

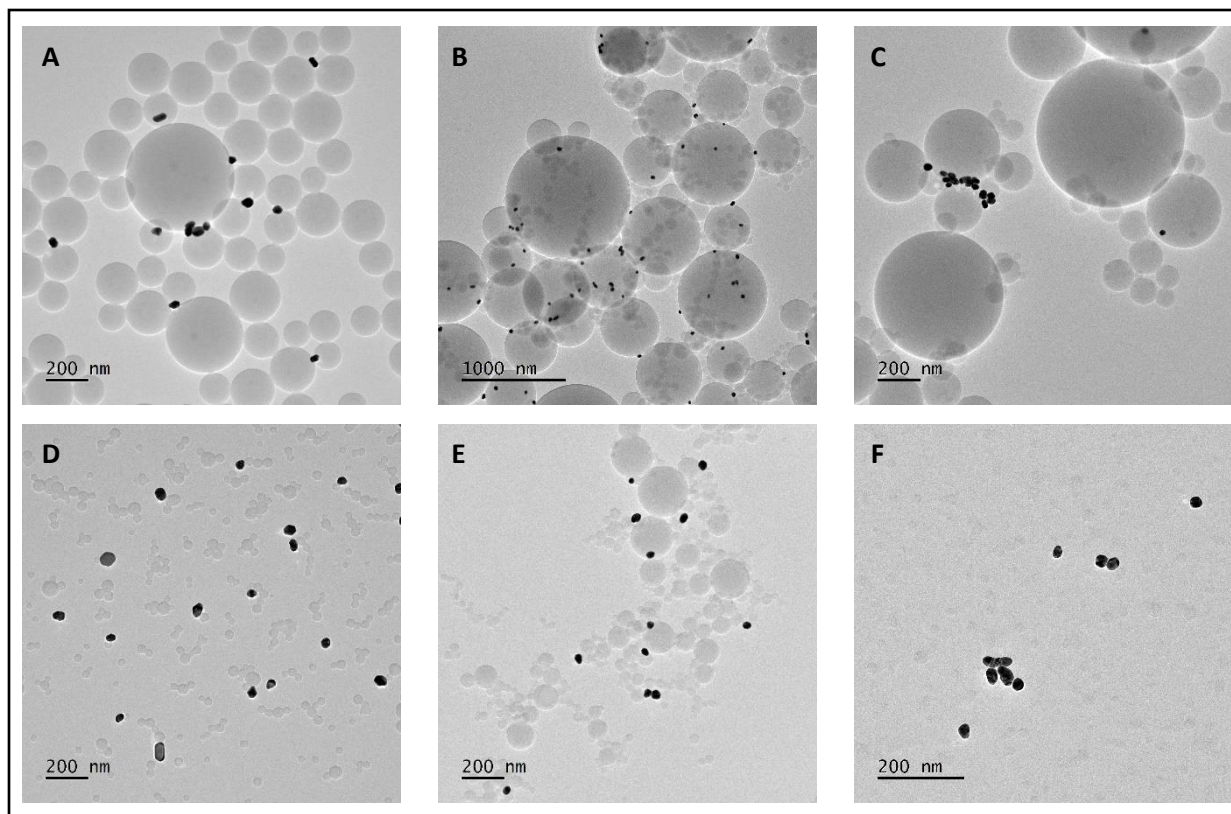


Figure 2. 21 : Images en TEM de A) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>0,9\_0,03, B) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>1,1\_0,03, C) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>1,4\_0,03, D) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>0,9\_1,66, E) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>1,1\_1,66 et F) PS18VBA\_Au<sub>H2O</sub>1,4\_1,66

En conclusion de cette partie portant sur l'élaboration de modèles de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques, le protocole de nanoprécipitation a été optimisé en faisant varier divers paramètres tels que la concentration en PS dans le THF, le ratio volumique de solvant (eau) sur non-solvant (THF) et la vitesse d'introduction. Ce protocole ainsi optimisé conduit à l'obtention de nanoplastiques de diamètre moyen de 308 nm. Par ailleurs, il est possible de s'appuyer sur la modification de nombreux paramètres de ce procédé pour moduler la taille des nanoplastiques. Pour augmenter la taille, il est ainsi possible d'augmenter le ratio volumique de solvant sur non-solvant, d'augmenter la concentration en PS, de diminuer les volumes engagés, de diminuer la vitesse d'agitation et de diminuer la vitesse d'introduction du solvant dans le non-solvant. De plus, ce protocole de nanoprécipitation fonctionne sur des polymères de type PS non fonctionnalisés et fonctionnalisés. Cette technique d'élaboration de nanoplastiques qui est simple à mettre en œuvre et qui ne nécessite pas l'ajout de tensio-actifs pour stabiliser les dispersions est donc une candidate intéressante pour l'élaboration de nanoplastiques modèles avec ou sans présence de traceur.

Dans une seconde partie, l'utilisation de cette technique pour la synthèse de modèle de nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques a été étudiée. Tout d'abord, des dispersions

d'or en solvant organique et en milieu aqueux, qui serviront de traceurs, ont été synthétisées. La synthèse en milieu aqueux a permis l'obtention de trois dispersions de nanoparticules d'or de diamètres couvrant la gamme de 32 à 46 nm. La synthèse en milieu organique a permis elle, d'obtenir des nanoparticules de diamètre moyen de 21 nm. À partir de ces dispersions, le marquage des nanoplastiques a été entrepris en suivant deux stratégies. La première a été la co-nanoprécipitation du mélange dans le THF du PS et des nanoparticules d'or dans l'eau et la deuxième a été de nanoprécipiter les particules de PS dans les dispersions aqueuses de nanoparticules d'or. Après caractérisation en TEM, il s'est avéré que la deuxième stratégie ne conduit pas à l'obtention de modèles marqués puisque les nanoparticules d'or se situent en dehors des nanoplastiques modèles. La première stratégie en revanche, qui fonctionne uniquement sur des particules de PS fonctionnalisées (PS18AA et PS18VBA) a conduit à l'obtention de modèles de nanoplastiques marqués. Les caractérisations en TEM montrent en effet la présence des nanoparticules d'or non pas en dehors des nanoplastiques mais à l'intérieur ou à leurs surfaces. À ce stade, la position relative du traceur par rapport aux nanoplastiques ne peut pas être précisée, l'étude de ce paramètre est d'ailleurs nécessaire pour s'assurer que le traceur est bien encapsulé dans le nanoplastique. Les derniers essais de synthèse de modèles marqués avec le PS18VBA semblent aller dans le sens d'une encapsulation à cœur car la caractérisation en SEM met en évidence la présence de différentes nanoparticules d'or suivant le détecteur utilisé (Dark-Field et High-Angle Annular Dark-Field). Ces détecteurs enregistrent des images en utilisant des angles de diffraction différents et mettent donc en évidence des nanoparticules d'or avec des indices de diffraction différents. Cela pourrait traduire la présence de traceurs à différentes profondeurs des nanoplastiques et pourrait donc prouver que les traceurs sont bien encapsulés dans les nanoplastiques.

Les dispersions de nanoplastiques modèles marqués obtenues présentent de larges gammes de tailles de nanoplastiques et de diamètres équivalents de nanoparticules d'or. Les nanoplastiques vont ainsi d'une vingtaine de nanomètre à plusieurs centaines et les nanoparticules d'or se situent dans une gamme de 10 à 50 nm. Afin de produire des nanoplastiques modèles de PS présentant les caractéristiques intrinsèques de ce matériau, il est nécessaire de ne pas impacter la densité. Avec ces modèles, une étape de séparation des nanoplastiques trop denses (au-delà de 10% d'augmentation) est encore nécessaire et pourrait être réalisée par centrifugation. Ces modèles de nanoplastiques qui présentent une large gamme de tailles offrent l'avantage d'être représentatifs des tailles des nanoplastiques présents dans l'environnement. Mais s'il est nécessaire d'obtenir des populations plus monodisperses alors, la séparation en taille par AF4 pourrait être étudiée.

Enfin, le dernier aspect à étudier concernant ces nanoplastiques modèles marqués est le phénomène de désorption du traceur. La méthode de l'encapsulation a été choisie car elle devrait limiter voire empêcher les phénomènes de désorption. Compte tenu du temps imparti, ce volet n'a pas été étudié

au cours de cette thèse. Cette étude pourrait être réalisée dans plusieurs milieux afin de vérifier l'impact des caractéristiques physico-chimiques de ces matrices. L'AF4 pourrait être utilisée pour séparer les nanoplastiques modèles marqués des éventuels traceurs désorbés et ces traceurs pourraient ensuite être identifiés et quantifiés par SP-ICP-MS.

#### 4. Conclusion

Au cours de cette étude, de nouveaux modèles de nanoplastiques ont été obtenus. Les premiers ont été synthétisés par polymérisation en émulsion sans tensio-actif. Ces dispersions stables de nanoplastiques sont composées de PS réticulé qui sont de forme sphérique, monodisperses et fonctionnalisés en surface pour imiter l'oxydation de débris naturels. La méthode de nanopréciptation a quant à elle, permis l'obtention de dispersions de nanoplastiques plutôt sphériques à partir d'homopolymères de PS commercial ou synthétisés au laboratoire mais aussi à partir de copolymères de PS-PAA et de copolymères de PS-PVBA. En modifiant les paramètres de nanopréciptation, il est possible de moduler les diamètres des nanoplastiques obtenus.

La synthèse de nouveaux modèles de nanoplastiques réticulés a permis l'obtention de nanoplastiques modèles marqués par sorption de métal sous forme ionique. Les propriétés de gonflement en bon solvant (DMF) des nanoplastiques réticulés sont mises à profit pour faire pénétrer un métal sous sa forme ionique au sein des nanoplastiques. Des étapes de purification et de séchage ont ensuite permis d'obtenir des nanoplastiques marqués avec 58 ag de cuivre par nanoplastique, conférant à ce modèle une densité de 1,06, soit une augmentation de moins de 2% de la densité initiale du nanoplastique de type PS. Un marquage à une concentration supérieure est envisageable afin de dépasser largement la LOD de la méthode analytique qui est de 30 ag. Une expérience visant à quantifier les phénomènes de désorption du marqueur a été entreprise et a montré qu'au bout de 34 jours, 65% des traceurs métalliques ont été désorbés. Cependant, une étude portant sur des temps plus courts est nécessaire afin de déterminer si ce phénomène est raisonnable ou inexistant en début d'exposition.

L'élaboration de nanoplastiques sphériques par nanopréciptation a permis quant à elle, d'élaborer des nanoplastiques marqués par encapsulation de nanoparticules métalliques. Alors que le PS solubilisé dans du THF et nanoprécipté dans de l'eau contenant des nanoparticules d'or en dispersion n'a pas donné les résultats escomptés, la co-nanopréciptation d'un mélange de PS et de nanoparticules d'or dans du THF, s'est avérée efficace. Ce procédé a en effet permis l'obtention de nanoplastiques de diamètres compris entre 15 et 350 nm qui semblent contenir des nanoparticules d'or de diamètres compris entre 10 et 50 nm. À ce stade, nous ne pouvons pas affirmer que les nanoparticules d'or sont au cœur ou à la surface des nanoplastiques. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour clarifier la position relative des marqueurs. D'autre part, les nanoparticules d'or présentes dans les dispersions de nanoplastiques marqués sont très polydisperses, tout comme les diamètres des nanoplastiques. Afin de produire des nanoplastiques modèles ne présentant pas des densités trop éloignées de la densité intrinsèque du PS, il est encore nécessaire de développer une méthode de séparation permettant de ne retenir que les nanoplastiques les moins denses. Une séparation par

centrifugation pourrait être un moyen d'y parvenir et une séparation par AF4 pourrait sans doute permettre d'obtenir des dispersions monodisperses de nanoplastiques modèles.

## 5. Matériels et méthodes

### 5.1. Marquage par sorption d'ions métalliques

#### 5.1.1. Réactifs

L'eau MilliQ ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) a été obtenue par un système de purification d'eau Millipore (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le styrène ( $\geq 99\%$ , CAS 100-42-5), l'acide acrylique (99%, CAS 79-10-7), le persulfate d'ammonium (98%, CAS 7727-54-0) et le divinylbenzène (80%, CAS 1321-74-0) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés sans purification préalable. Les solutions organiques de cuivre ont été préparées à partir du sel  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (99,999%, Sigma-Aldrich, CAS 13778-31-9).

L'éthanol (99,8%, CAS 64-17-5), le N-N-diméthylformamide ( $\geq 98\%$ , CAS 68-12-2), l'acétone ( $\geq 99\%$ , CAS 67-64-1), le tétrahydrofurane ( $\geq 99\%$ , CAS 109-99-9) et l'acide nitrique (69-70%, CAS 7697-37-2) de grade AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag ont été achetés chez VWR. L'hexanol (98%, CAS 111-27-3) a été acheté chez Sigma-Aldrich.

L'hydroxyde de sodium ( $\geq 98\%$ , CAS 1310-73-2) et l'acide chlorhydrique (37%, CAS 7647-01-0) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le phosphate de sodium monobasique ( $\geq 98\%$ , CAS 7558-80-7) et le phosphate de sodium dibasique ( $\geq 99\%$ , CAS 7558-79-4) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

#### 5.1.2. Synthèse des particules de PS réticulé

La synthèse des particules de PS réticulé est basée sur le protocole développé par notre équipe<sup>81</sup> qui a été adapté pour introduire un réticulant, le divinylbenzène (DVB). Le protocole de synthèse des particules de PS réticulé est le suivant. La réaction de copolymérisation a lieu en atmosphère inerte, tous les réactifs sont dégazés sous flux d'azote. Dans un ballon tricol, sont ajoutés, dans cet ordre :  $V_{\text{eau MilliQ}} = 218 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{acide acrylique}} = 1,44 \text{ mL}$  ( $n = 0,021 \text{ mol}$ ) et  $V_{\text{styrène}} = 10,65 \text{ mL}$  ( $n = 0,093 \text{ mol}$ ). Une solution de persulfate d'ammonium (APS) à  $0,35 \text{ mol L}^{-1}$  est préparée séparément ( $m_{\text{APS}} = 0,4 \text{ g}$  dans  $V_{\text{H}_2\text{O}} = 4,6 \text{ mL}$ ). Une fois le milieu réactionnel à  $70^\circ\text{C}$  et sous agitation, l'amorceur de la polymérisation, l'APS, est ajouté à hauteur de  $1 \text{ mL}$  ( $n = 0,35 \text{ mmol}$ ). Au bout d'1h30 de réaction,  $V_{\text{DVB}} = 0,38 \text{ mL}$  ( $n = 0,003 \text{ mol}$ ) est ajouté au goutte-à-goutte pendant environ 1h. Après 7h de réaction, le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante puis filtré sur compresse et purifié par plusieurs cycles de centrifugation (30 min, 12 000 rpm, Avanti J30-I, Beckman Coulter). Après chaque centrifugation, le surnageant est retiré, un volume équivalent d'eau MilliQ est ajouté, puis les particules sont redispersées par des cycles de sonication (10 min, TopMix FB 15024, Fisher Scientific) et d'agitation *via* un agitateur à vortex (10 min, USC500TH, VWR). L'étape de purification est validée lorsque le

surnageant a une conductivité égale ou inférieure à celle de l'eau désionisée ( $\leq 40 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre SevenExcellence de Mettler Toledo équipé d'une électrode ( $\sigma : 0,01 - 100 \text{ ms cm}^{-1}$  ; température :  $0 - 100^\circ\text{C}$ ). Les pourcentages (molaires ou massiques) des réactifs sont reportés dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Tableau 2. 15 : Pourcentages molaires ( $n/n$ ) ou massiques ( $w/w$ ) des réactifs dans la synthèse des particules de PS réticulé

| Paramètre | % $n/n$ amorceur<br>(/ $\Sigma$ monomères) | % $n/n$ acide acrylique<br>(/ $\Sigma$ monomères) | % $w/w$ monomères<br>(/ $m_{\text{eau MilliQ}}$ ) | % $n/n$ DVB<br>(/ styrène) |
|-----------|--|---|---|----------------------------|
| Valeur    | 0,3  | 18  | 5   | 3                          |

### 5.1.3. Caractérisations des particules de PS réticulé

Les diamètres hydrodynamiques ( $d_H$ ) ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (VascoFlex, Cordouan Technologies). Les analyses DLS sont composées d'une moyenne de cinq mesures de 60 s. Le diamètre hydrodynamique moyen a été déterminé en ajustant une distribution normale aux données brutes à l'aide de l'algorithme des cumulants.

La quantité de groupes carboxyliques à la surface des particules de PS réticulé a été déterminée par titrage à l'aide d'un Titrando 888 équipé d'un agitateur 728 et d'une électrode de verre pH combinée ( $\text{pH} : 0 - 14$  ; température :  $0 - 80^\circ\text{C}$  ;  $[\text{KCl}] = 3 \text{ mol L}^{-1}$ ). Le pH des dispersions a été ajusté à  $\text{pH} > 11$  avec une solution de NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) avant le titrage avec une solution de HCl ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ )<sup>81</sup>.

La charge de surface (ou potentiel zêta) des particules a été déterminée à l'aide d'un zétamètre (Malvern Panalytical). Le zétamètre mesure la mobilité électrophorétique des particules colloïdales par électrophorèse laser Doppler. L'échantillon est dilué à  $10 \text{ mg L}^{-1}$  dans une solution tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Les analyses de potentiel zêta sont composées d'une moyenne de cinq mesures de 60 s.

Les images de microscopie à force atomique (AFM) ont été obtenues à l'aide d'un microscope MultiMode 8 Atomic Force (Bruker) réglé en mode PeakForce Quantitative NanoMechanics (QNM). Les échantillons ont été déposés sur des wafers en silicium ( $30 \mu\text{L}$ ) préalablement soumis à un flux d'ozone pendant 10 min (UVO cleaner, Jelight company). Après le dépôt, l'échantillon a été placé dans un spin-coater (SPIN150, APT GmbH) afin de créer un film mince à la surface du wafer. Les paramètres de spin-coating sont composés d'une étape à 1500 rpm pendant 60 s suivie d'une seconde étape à 3000 rpm pendant 3 s.

#### 5.1.4. Séchage des dispersions de particules de PS réticulé

Les dispersions de particules de PS réticulé ont été lyophilisées pendant 48 h à  $-80^{\circ}\text{C}$  et 80 Pa (Crios-80, Cryoytec).

#### 5.1.5. Marquage des particules de PS réticulé

Le protocole de marquage commence par la préparation d'une solution concentrée de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  dans du DMF ( $[\text{Cu}] = 10\,000\text{ mg L}^{-1}$ ) par dissolution du sel correspondant. Pour un ratio PS : Cu ( $\text{mg L}^{-1}$ ) = 1 : 0,01 ; 0,01 mL d'une solution de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  dans du DMF ( $[\text{Cu}] = 10\,000\text{ mg L}^{-1}$ ) est introduit dans 9,9 mL de DMF contenant 10 mg de particules de PS réticulé. Les échantillons sont placés sur une table oscillante et agités pendant 6 jours (480 rpm, KS 130 basic, IKA). Les échantillons sont ensuite purifiés par centrifugation (30 min – 12 000 rpm, Avanti J30-I, Beckman Coulter). Le surnageant est retiré et remplacé par un volume équivalent d'eau MilliQ puis les particules sont redispersées par agitation *via* un agitateur à vortex (10 min, USC500TH, VWR).

#### 5.1.6. Caractérisations des modèles de nanoplastiques marqués

La quantité de métal par nanoplastique modèle ainsi que la quantité de métal libre (en dehors des nanoplastiques) dans les échantillons ont été déterminées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (SP-ICP-MS) à l'aide d'un NexION 5000 ICPMS avec un module Syngistix Nano (PerkinElmer, Shelton, CT). Le  $^{63}\text{Cu}$  a été mesuré avec un temps de lecture de 100  $\mu\text{s}$  pendant un temps d'acquisition total de 100 s. L'efficacité du transport a été calculée selon les méthodes de fréquence et de taille des particules décrites par Pace *et al.*<sup>153</sup> en utilisant une suspension standard de nanoparticules d'or de 30 nm (30nm Gold Nanospheres, PEG Carboxyl, Ultra Uniform, nanoComposix) comme matériau de référence. Le débit de l'échantillon a été calculé quotidiennement en mesurant la masse d'eau absorbée par la pompe péristaltique pendant 2 min. Cette opération a été répétée deux fois et les valeurs moyennes ont été utilisées pour les calculs.

La quantité totale de métal présente dans les nanoplastiques modèles a été déterminée par analyse ICP-MS en mode normal avec un Agilent 7900 (Agilent Technologies, Japon) équipé avec une cellule de collision/réaction. L' $\text{H}_2$  a été utilisé comme gaz de réaction à un débit de  $5\text{ mL min}^{-1}$  pour mesurer les isotopes  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{65}\text{Cu}$ . Chaque échantillon a été analysé en triplicata. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de trois mesures.

La morphologie ainsi que la cartographie chimique élémentaire des nanoplastiques modèles ont été déterminées par analyse *via* un microscope électronique à balayage (JEOL JSM-IT800LA) équipé d'une

sonde de spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (modèle Oxford Xmax) à une tension d'accélération de 2 kV et un temps d'acquisition de 2 minutes avec correction de dérive. Les échantillons n'ont pas été métallisés et ont été déposés sur des wafers en silicium (30  $\mu$ L) préalablement soumis à un flux d'ozone pendant 10 min (UVO cleaner, Jelight company). Après le dépôt, l'échantillon a été placé dans un spin-coater (SPIN150, APT GmbH) afin de créer un film mince à la surface du wafer. Les paramètres de spin-coating sont composés d'une étape à 1500 rpm pendant 60 s suivie d'une seconde étape à 3000 rpm pendant 3 s.

## 5.2. Marquage par encapsulation de nanoparticules métalliques

### 5.2.1. Réactifs

L'eau MilliQ (18,2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>) a été obtenue par un système de purification d'eau Millipore (Merck, Darmstadt, Allemagne).

L'acide tétrachloroaurique trihydraté ( $\geq$  99,9%, CAS 16961-25-4), le citrate de sodium tribasique dihydraté ( $\geq$  99%, CAS 6132-04-3), le 1-decanethiol (96%, CAS 143-10-2) et le tétrahydroborate de sodium ( $\geq$  98%, CAS 16940-66-2) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le tétrahydrofurane ( $\geq$  99%, CAS 109-99-9), l'éthanol (99,8%, CAS 64-17-5), le toluène ( $\geq$  98%, CAS 108-88-3) et le méthanol ( $\geq$  98%, CAS 67-56-1) ont été achetés chez VWR.

Le styrène ( $\geq$  99%, CAS 100-42-5), l'acide acrylique (99%, CAS 79-10-7), le persulfate d'ammonium (98%, CAS 7727-54-0), le 2,2'-azobisisobutyronitrile (98%, CAS 78-67-1) et l'acide 4-vinylbenzoïque (97%, CAS 1075-49-6) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le (triméthylsilyl)diazométhane (2M en solution dans de l'hexane, CAS 18107-18-1) a été acheté chez Fisher scientific.

L'homopolymère de PS en poudre avec des particules de taille moyenne de 250  $\mu$ m de référence Goodfellow 893-112-48 a été acheté chez Sigma-Aldrich.

### 5.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or

- En phase aqueuse

Pour exemple, le protocole de synthèse de nanoparticules d'or en phase aqueuse est le suivant pour un ratio molaire réducteur/or de 1,1. 51 mL d'une solution aqueuse d'acide tétrachloroaurique trihydraté (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O) à 0,47 mM (8,1 mg, 0,024 mmol) sont placés sous agitation et portés à

ébullition avant l'ajout de 0,75 mL d'une solution aqueuse de citrate de sodium tribasique dihydraté à 36 mM (8 mg, 0,027 mmol). Après ajout du réducteur, la solution vire petit à petit du jaune au rouge bordeaux. Après 10 minutes d'agitation, le chauffage est arrêté et la dispersion est laissée sous agitation jusqu'au retour à  $T_{amb}$ .

- En milieu organique

Le protocole de synthèse de nanoparticules d'or dans le THF est le suivant. Dans un ballon de 50 mL muni d'un barreau aimanté, sont introduit 0,1 g d'acide tétrachloroaurique trihydraté (0,29 mmol), 20 mL de THF et 75  $\mu$ L de decanethiol à 1 mol L<sup>-1</sup> (13 mg, 0,075 mmol), et l'agitation est réglée à 1000 rpm. Une solution de tétrahydruoborate de sodium (NaBH<sub>4</sub>) à 0,61 M est préparée avec un ratio eau : THF de 1 : 9 ( $m_{NaBH_4} = 0,23$  g dans  $V_{tot} = 10$  mL). Dans le ballon contenant le sel d'or, 0,6 mL de la solution de NaBH<sub>4</sub> (14 mg, 0,36 mmol) est rapidement introduit. La dispersion vire tout de suite au rouge bordeaux. La dispersion est ensuite filtrée (filtre en cellulose de bois et de coton, porosité 7 – 10  $\mu$ m, VWR) afin de retirer les agrégats qui représentent environ 12% du rendement total.

### 5.2.3. Nanoprécipitation

Le protocole de nanoprécipitation du PS est le suivant et est inspiré de l'étude de Zhao *et al.*<sup>145</sup>. Dans un ballon de 50 mL,  $V_{eau\ MilliQ} = 16$  mL est introduit et placé sous agitation à 650 rpm. L'agitation doit être la plus importante possible sans que le vortex créé par l'agitation ne laisse le barreau aimanté à l'air libre. À l'aide d'une seringue, 2 mL de PS solubilisé dans du THF à 10 g L<sup>-1</sup> sont prélevés puis rapidement injectés dans l'eau MilliQ (l'aiguille doit être immergée dans l'eau). Le solvant organique est ensuite évaporé pendant environ 30 minutes en plaçant le ballon dans un bain d'huile chauffé à 70°C et en faisant barboter le contenu du ballon sous un flux d'azote. Après retour à  $T_{amb}$ , la dispersion est filtrée sur compresse pour retirer les éventuels agrégats.

### 5.2.4. Polystyrènes et copolymères utilisés

Quatre polymères de ou à base de polystyrène ont été utilisés. Le premier est un PS commercial de masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de 180 000 g mol<sup>-1</sup> avec une dispersité de 1,5 (déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES)). Les 3 autres (co)polymères ont été synthétisés au laboratoire.

Le PS18AA est un copolymère de PS et de poly(acide acrylique) (PAA) avec un ratio molaire acide acrylique / quantité totale de monomère (styrène + acide acrylique) égal à 18. Le protocole précédemment décrit par notre équipe<sup>81</sup> a été suivi pour cette synthèse. Ces polymères ont une masse

molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de 218 600 g mol<sup>-1</sup> avec une dispersité ( $\mathcal{D}$ ) de 2,5 (paramètres déterminés par CES).

Le PS-AIBN est un homopolymère de PS dont la réaction de polymérisation a été amorcée par le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN). La synthèse est réalisée sous atmosphère inerte. Dans un ballon contenant un barreau aimanté,  $m_{\text{AIBN}} = 0,13$  g est introduite puis le ballon est dégazé 10 min sous flux d'azote.  $V_{\text{styrène}} = 15$  mL est ensuite ajouté dans le ballon réactionnel puis le ballon est dégazé 10 min de plus sous flux d'azote. Le ballon est ensuite mis sous agitation et plongé dans un bain d'huile chauffé à 75°C pour une durée de 15h. À la fin de la réaction, le mélange est laissé revenir à  $T_{\text{amb}}$  puis est repris au THF. Finalement, le polymère est précipité dans de l'éthanol à - 10°C puis séché sous micro-ondes avec filtre sécheur (Microwave Reaction System SOLV, Anton Paar) jusqu'à masse constante. Ces polymères ont une masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de 550 000 g mol<sup>-1</sup> avec une dispersité ( $\mathcal{D}$ ) de 1,4 (paramètres déterminés par CES).

Le PS18VBA est un copolymère de PS et de poly(acide 4-vinylbenzoïque) (PVBA) avec un ratio molaire acide 4-vinylbenzoïque / quantité totale de monomère (styrène + acide 4-vinylbenzoïque) égal à 18,5. La synthèse est réalisée sous atmosphère inerte et est décrite dans les travaux de thèse d'Antoine Aynard<sup>80</sup>. Dans un ballon sont ajoutés 2,5 g de VBA (16,7 mmol), 0,3 g d'AIBN (1,8 mmol), 8,5 mL de styrène (74 mmol) et 10 mL de toluène. Le mélange réactionnel est soumis à agitation dans un bain d'huile chauffé à 70°C pendant 14h. À la fin de la réaction, le mélange est laissé revenir à  $T_{\text{amb}}$  puis est repris au THF. Finalement, le polymère est précipité dans du méthanol à - 10°C puis séché à l'air libre jusqu'à masse constante. Ces polymères ont une masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de 31 200 g mol<sup>-1</sup> avec une dispersité ( $\mathcal{D}$ ) de 3,9 (paramètres déterminés par CES).

Les échantillons synthétisés en dispersion aqueuse (PS18AA) ont été séchés par lyophilisation pendant 48 h à - 80°C et 80 Pa (Crios-80, Cryoytec) avant d'être solubilisés dans du THF à 10 g L<sup>-1</sup>.

### 5.2.5. Caractérisations

Les diamètres hydrodynamiques ( $d_H$ ) ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (VascoFlex, Cordouan Technologies). Les analyses DLS sont composées d'une moyenne de cinq mesures de 60 s. Le diamètre hydrodynamique moyen a été déterminé en ajustant une distribution normale aux données brutes à l'aide de l'algorithme des cumulants. Afin de caractériser la présence de plusieurs populations de tailles différentes dans un échantillon, l'algorithme Sparse Bayesian Learning (SBL) a également été utilisé.

La quantité de métal par nanoplastique modèle ainsi que la quantité de métal libre (en dehors des nanoplastiques) dans les échantillons ont été déterminées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (SP-ICP-MS) à l'aide d'un NexION 5000 ICPMS avec un module Syngistix Nano (PerkinElmer, Shelton, CT). Le  $^{197}\text{Au}$  a été mesuré avec un temps de lecture de 100  $\mu\text{s}$  pendant un temps d'acquisition total de 100 s. L'efficacité du transport a été calculée selon les méthodes de fréquence et de taille des particules décrites par Pace *et al.*<sup>153</sup> en utilisant une suspension standard de nanoparticules d'or de 30 nm (30nm Gold Nanospheres, PEG Carboxyl, Ultra Uniform, nanoComposix) comme matériau de référence. Le débit de l'échantillon a été calculé quotidiennement en mesurant la masse d'eau absorbée par la pompe péristaltique pendant 2 min. Cette opération a été répétée deux fois et les valeurs moyennes ont été utilisées pour les calculs.

Les analyses de spectroscopie UV-visible sont réalisées sur le modèle UV-2450 de Shimadzu avec un pas de mesure de 1 nm. Les mesures sont réalisées dans de l'eau MilliQ ou dans du THF dans des cuves en quartz de longueur optique de 1 cm.

Les analyses de microscopie électronique à transmission sont réalisées sur un microscope Talos F200S G2 (ThermoFisher) équipé d'une caméra ONE View (Gatan) à une tension d'accélération de 200 kV. Pour l'acquisition, le logiciel Digitalmicrograph GMS3 (Gatan) est utilisé. Avant dépôt sur la grille (carbone en cuivre de maillage 150 mesh), l'échantillon est soniqué pendant 1 minute. Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés sur la grille TEM préalablement hydrophilisée à l'aide d'un plasmacleaner (Nanoclean Model 1070, Fischione). Le dépôt est ainsi laissé pendant 1 min puis l'excédent est retiré à l'aide d'un papier filtre posé perpendiculairement à la grille. La grille est ensuite laissée à l'air libre pour séchage puis stockée dans une boîte de Petri.

Les analyses de microscopie électronique à balayage sont réalisées sur un microscope Apreo 2S (ThermoFisher) avec un détecteur STEM en mode dark field (DF) et en mode high-angle annular dark-field (HAADF) à une tension d'accélération de 30 kV. Le dépôt sur la grille (formvar/carbone de type B en cuivre de maillage 400 mesh) est réalisé sur le côté carbone avec 2,5  $\mu\text{L}$  d'échantillon et l'excédent est retiré à l'aide d'un papier absorbant.

Les masses molaires des polymères ainsi que leurs dispersités ( $\text{Đ}$ ) ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES). L'instrument est équipé d'un injecteur Viscotek VE 5200, d'une pré-colonne suivie de deux colonnes (Styragels HR 5E et 4E (7,8 x 300 mm)) en série et de trois détecteurs. Les détecteurs sont un détecteur de diffusion de lumière multiangle Wyatt Heleos II (18 angles,  $\lambda_0 = 664,4 \text{ nm}$ ), un détecteur viscosimètre (Wyatt Viscostar II) et un détecteur d'indice de réfraction (Viscotek VE 3580). Le toluène est utilisé comme marqueur, l'éluant est le THF, la température de fonctionnement est de 30°C et le débit de travail est de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Toutes les mesures

ont été réalisées en triplicata avec comme volumes d'injection : 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  et 150  $\mu\text{L}$ . Les copolymères ont été analysés après dérivatisation des fonctions carboxyliques par le (triméthylsilyl)diazométhane suivant le protocole proposé par Kühner *et al.*<sup>154</sup>.





**Chapitre 3 : Particules de polystyrène carboxylé pour la synthèse  
d'étalons plastiques pour l'analyse de métaux par ablation laser  
couplée ICP-MS**



## Sommaire

|   |     |
|---|-----|
| Résumé en français .....  | 134 |
| Abstract .....  | 137 |
| 1. Introduction.....  | 139 |
| 2. Materials and methods .....  | 141 |
| 2.1. Materials.....   | 141 |
| 2.2. Elaboration of metal-doped plastic standards .....                   | 141 |
| 2.3. Metal analysis.....  | 141 |
| 2.4. Nanoplastics model materials characterisations .....                 | 142 |
| 2.5. Metal sorption.....  | 142 |
| 2.6. Ablation characterisation .....                                      | 143 |
| 3. Results and discussion.....  | 144 |
| 3.1. Trace element enrichment of carboxylated polystyrene particles ..... | 144 |
| 3.2. Metal dispersion analysis by LA-ICP-MS technique .....               | 146 |
| 4. Conclusion .....   | 150 |

### Résumé en français

Le plastique, qui est produit et utilisé à un rythme très soutenu depuis les années 1950 est disséminé dans tous les compartiments environnementaux. Une des caractéristiques du plastique qui est au cœur des préoccupations est sa capacité à adsorber des polluants rencontrés dans l'environnement et à les transporter. Il est nécessaire de caractériser ce phénomène, souvent nommé effet Cheval de Troie, pour mieux appréhender les impacts et les risques qu'entraînent la pollution plastique. Dans ce chapitre, l'adsorption de métaux par des nanoplastiques modèles, constitués de particules de polystyrène carboxylé, a été étudiée, puis cette propriété a été mise à profit pour élaborer des matériaux permettant le développement d'une méthode analytique de quantification des métaux dans des microplastiques.

Les capacités d'adsorption de métaux ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) de nanoplastiques modèles présentant des fonctions carboxyliques en surface ont été déterminées. Ces modèles sont synthétisés par un procédé en émulsion sans tensio-actif, ce sont des particules sphériques dont la surface est fonctionnalisée par des fonctions carboxyliques à l'image de la surface de débris plastiques vieillis et oxydés en milieu naturel. Les isothermes d'adsorption ont été réalisés et sont modélisés selon la théorie des isothermes de Freundlich qui décrit une adsorption multicouche (Equation 1). La Figure 1 présente un exemple des résultats obtenus, ici sur l'adsorption du plomb  $Pb^{2+}$ .

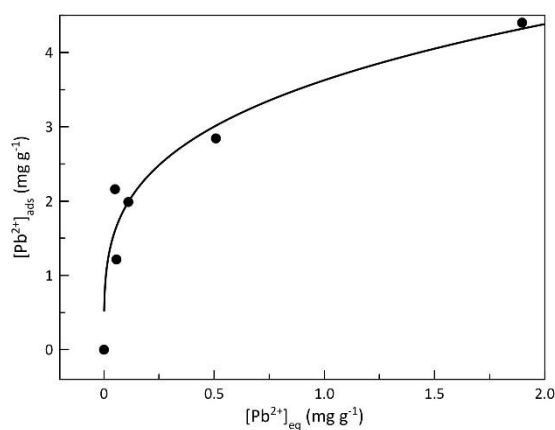


Figure 1 : Exemple d'isotherme d'adsorption du plomb  $Pb^{2+}$  sur des particules de polystyrène carboxylé et modélisation des données selon le modèle de Freundlich.  $K_{ads} = 3,63$  et  $n = 0,23$ . L'équation de Freundlich est reportée en Equation 1

---

$$Q_e = K_{ads} * C_e^n \quad \text{Equation 1}$$

- Avec
- $Q_e$  la concentration en métal adsorbé ( $\text{mg g}^{-1}$ )
  - $K_{ads}$  la constante d'adsorption de Freundlich à l'équilibre
  - $C_{eq}$  la concentration en métal à l'équilibre ( $\text{mg g}^{-1}$ )
  - $n$  le coefficient de non-linéarité

Les coefficients de corrélation pour le  $\text{Mn}^{2+}$ , le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Pb}^{2+}$  obtenus sont respectivement de 0,96 ; 0,94 ; 0,95 et traduisent des processus de sorption basés sur une sorption multicouche sur une surface hétérogène. Par ailleurs, la constante d'adsorption de Freundlich du  $\text{Pb}^{2+}$  sur ces nanoplastiques modèles a pu être comparée à une valeur disponible dans la littérature sur des nanoplastiques modèles produits par sonication à partir de microplastiques environnementaux. La valeur trouvée pour les modèles de nanoplastiques utilisés dans notre étude est légèrement inférieure (3,63 pour nos nanoplastiques modèles et 4,89 pour les nanoplastiques issus de microplastiques environnementaux) et cette différence peut sans doute s'expliquer par une différence d'oxydation des nanoplastiques modèles, avec des surfaces plus oxydées pour les nanoplastiques issus de microplastiques environnementaux. Nos nanoplastiques modèles restent cependant pertinents pour caractériser le comportement de nanoplastiques environnementaux puisque la valeur de la constante d'adsorption de Freundlich pour le  $\text{Pb}^{2+}$  est du même ordre de grandeur.

Les résultats de cette première expérience mettent donc bien en évidence les capacités de sorption des métaux par les nanoplastiques modèles. Afin d'appréhender la toxicité des débris plastiques il est important de caractériser leurs teneurs en métaux ad/absorbés. Pour l'analyse des métaux dans des plastiques, il existe plusieurs méthodes analytiques divisibles en deux grandes catégories. Tout d'abord, les méthodes analytiques permettant de déterminer les concentrations totales en métaux dans un échantillon (ICP-MS, ICP-OES, ICP-AES, AAS, ...) et ensuite, les méthodes permettant de caractériser la présence de métaux en surface d'un échantillon (LA-ICP-MS, XRF, ...). Cependant, pour passer de la caractérisation à la quantification, il est nécessaire de calibrer le signal avec des matériaux de référence certifiés (MRC). Quelques MRC sont disponibles dans le commerce, et d'autres étalons sont proposés à la synthèse dans la littérature. La plupart de ces matériaux (MRC et étalons) reposent sur des protocoles basés sur l'extrusion. L'extrusion nécessite de faire pénétrer à chaud un sel métallique dans une matrice polymère à l'état fondu. Pour y parvenir, le sel métallique (ion métallique et contre-ion) doit être compatible à la matrice polymère et ses éventuels additifs et aux conditions d'extrusion. Le nombre de couples ion métallique/contre-ion compatibles avec cette méthode, et menant à des plastiques au sein desquels la charge métallique est uniformément répartie, est assez limitée. Dans ce

contexte, nous proposons une nouvelle méthode de synthèse d'étalons de plastique basée sur la capacité de nos nanoplastiques modèles à adsorber des métaux. Après exposition des nanoplastiques modèles à des solutions de sels métalliques, ceux-ci ont été purifiés, séchés et mis en forme pour l'obtention de pastilles. La répartition homogène des métaux dans ces pastilles a été vérifiée par LA-ICP-MS en réalisant des ablations à différents endroits et à plusieurs profondeurs. Ces pastilles ont été validées en tant qu'étalons et utilisées pour calibrer le signal de LA-ICP-MS. La Figure 2 présente un exemple des résultats de calibration obtenus, ici pour le  $\text{Pb}^{2+}$ . Les droites de calibration déterminées présentent de bonnes linéarités, sauf pour le  $\text{Mn}^{2+}$  dont la calibration nécessiterait la synthèse d'étalons supplémentaires.

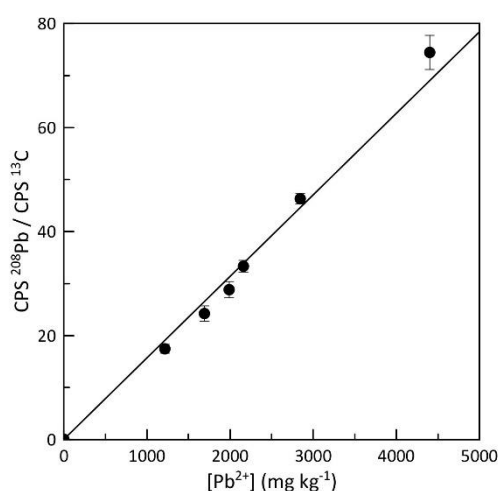


Figure 2 : Courbe de calibration du signal de LA-ICP-MS obtenue sur le plomb  $\text{Pb}^{2+}$

Finalement, les résultats obtenus dans cette étude ouvrent la voie à la synthèse d'étalons de plastique basée sur la capacité de sorption des métaux par les nanoplastiques. Bien que le protocole présenté ici se restreigne à quatre métaux, il pourrait être étendu à d'autres métaux, en fonction des besoins analytiques. De plus, l'étude des isothermes et des cinétiques d'adsorption des métaux sur les nanoplastiques modèles qui sont la brique élémentaire de ces nouveaux étalons, permettra de les synthétiser à des teneurs en métal ciblées.

## **Carboxylated polystyrene particles for plastic standards in laser ablation ICP-MS trace element analysis**

Maud Gautier, Sandra Mounicou, Javier Jiménez-Lamana, Bruno Grassl, Stéphanie Reynaud

Universite de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM, Pau, France

### **Abstract**

The transport pathways, fate, and impact of plastic waste are to be still understood, even more as the size of the plastic debris decreases. Microplastics, having a size between 1  $\mu\text{m}$  and 5 mm, spread throughout all environmental compartments and food webs. The scientific studies should consider the entire chemical composition of these materials, those from the initial composition and the chemicals that have been sorbed during their use and their transport within the environment. Indeed, plastics are able to sorb environmental pollutants and eventually transport and spread them in different compartments. Among pollutants, we focus onto metals and developed a method for quantifying metal concentrations in microplastics, up to 65  $\mu\text{m}$  deep, by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). The method uses plastic standards composed of metal embedded materials for calibration. Those standards are a polymer matrix with added metals in concentrations ranging from 0 to 360  $\text{mg kg}^{-1}$ , 0 to 220  $\text{mg kg}^{-1}$ , 0 to 600  $\text{mg kg}^{-1}$  and 0 to 4400  $\text{mg kg}^{-1}$  for  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively. Limits of detection are 81  $\text{mg kg}^{-1}$ , 24  $\text{mg kg}^{-1}$ , 28  $\text{mg kg}^{-1}$  and 270  $\text{mg kg}^{-1}$  for  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively with coefficients of determination ranging from 0.961 to 0.998.

### **Keywords**

LA-ICP-MS, signal calibration, plastic standards, microplastics, trace element quantification.

Graphical abstract

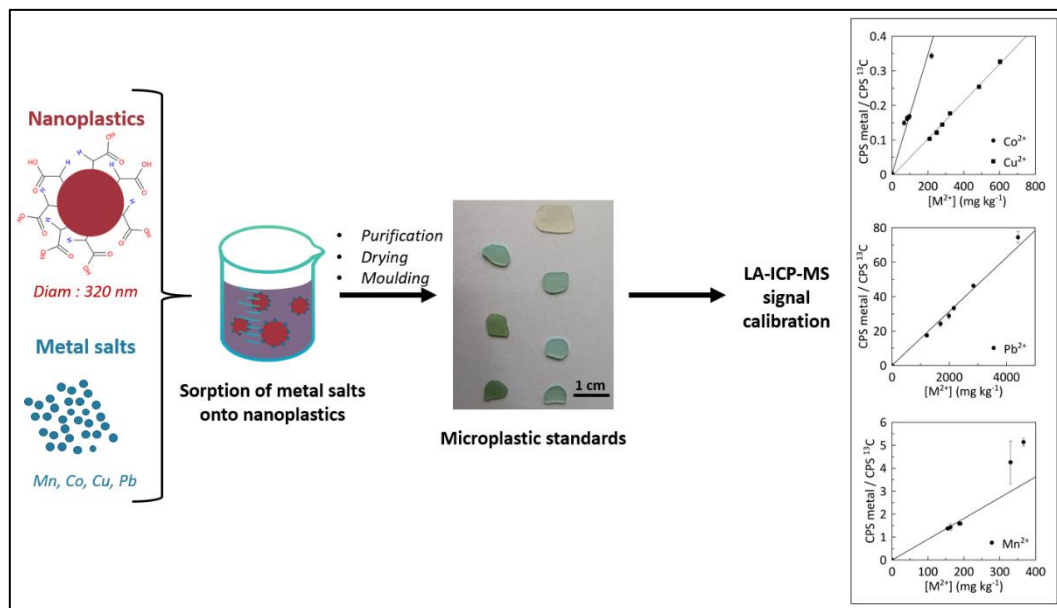


Figure 3. 1: Graphical abstract.

## 1. Introduction

Plastic pollution is a growing concern, since the smaller the debris, the more they spread throughout all environments and trophic compartments<sup>155</sup>. The scientific studies devoted to better know the impact and the risks we are exposed should not be limited to the producer formulation since plastics are known to sorb additional chemicals during their use or transport in the environment. This feature called Trojan horse effect was described in the literature, particularly with regard to metals<sup>75,156</sup>. Metals that are added from the synthesis of the plastic, are either needed for the polymer elaboration or as additives to modulate the properties of the end product. For example, chromium and mercury can be used as polymer catalysts<sup>157</sup>, copper can be used as biocide<sup>75</sup>, and cobalt, lead and manganese can be used as plastic dyes<sup>157</sup>. It has also been shown that plastics in the environment are likely to sorb contaminants that they encounter, such as metals. Holmes *et al.*<sup>158</sup> reported metal concentrations found in environmental microplastics equal to or higher than concentrations found in sediments taken from the same sampling site. Their study also showed higher metal adsorption capacities for environmental aged microplastics than for pristine microplastics. Another study<sup>159</sup> analysed the adsorption capacity of microplastics in the environment over a period of one year. They showed that metal concentrations increased over the time and two-thirds of the metals studied did not reach saturation. This suggests that the longer plastic debris stays in the environment, the more metals it may contain. Once at sea, those plastic debris that contain sorbed potentially toxic metals, may be transferred to aquatic organisms leading to bioaccumulation as it has been reported in the literature<sup>160,161</sup>. Microplastics are thus pollutant carriers and their characteristics should be known given the toxic nature of the sorbed metals for living organisms<sup>162</sup>.

Among the analytical methods developed to study metals in plastics<sup>163</sup>, some analyse the bulk content of metals (*i.e.*: throughout the whole volume of samples) and others only analyse the sample surface. The first category includes, for example, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and atomic absorption spectrometry (AAS). These techniques require the treatment of the samples *via* mineralisation or digestion in acid solution and the use of commercial ionic metal standards enables the quantification of metal concentrations. The second category includes surface analysis techniques as X-ray fluorescence analysis (XRF) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) as examples. The main differences between these two techniques is that XRF is a non-destructive method, whereas LA-ICP-MS is a destructive technique. Furthermore XRF can be used to analyse elements that are difficult to analyse by ICP-MS, such as S, Br or Cl. LA-ICP-MS was previously reported to be capable of discriminating metals present as additives and metals adsorbed in the environment<sup>99</sup>, which is not possible by ICP-MS.

However, if the detection and the identification of the metal origin was possible by LA-ICP-MS, the quantification of the embedded metals remains difficult or even impossible because of the lack of standard materials containing certified metal concentrations. To fill this gap, numerous studies reported the elaboration of reference materials or plastic standards, through extrusion<sup>164-172</sup>. Extrusion involves the metal salt intake into a polymer matrix in the molten state. To be successful, the process needs a metal salt compatible not only with the process conditions but also with the polymer matrix: the counterion of the metal ion should promote the dispersion of the metal salt inside the material. The synthesis of reference materials and plastic standards by extrusion therefore relies on the existence of the metal salt with the right counterion, and this list is limited. Furthermore, Mans *et al.*<sup>168</sup> point out that during the extrusion process, there is a partial loss of the added metals, leading to overestimating the concentration inside the final material. In addition, with this elaboration method, it is crucial to ensure the homogeneity introduction of metals into the plastic standards. This requires the meticulous study of homogeneity at two distinct levels: microscopic homogeneity within an individual standard and macroscopic homogeneity across several standards from the same production batch. In addition, several studies showed that metal salts are less homogeneously dispersed than organic salts within plastic materials<sup>169,173</sup>. Nevertheless, the extrusion process is widespread and has led to the marketing of certified reference materials such as CRM 680 and 681<sup>171</sup>, VDA 001-4<sup>172</sup> and NMIJ 8123-a and 8133-a<sup>170</sup>. But the list of metals is limited (As, Br, Cd, Cl, Cr, Hg, Pb and S) and most of the metals were added in the form of metal salts, which required several extrusions to ensure metal homogeneity.

Other approaches to synthesise plastic standards must therefore be considered. Our strategy is to take advantage of the ability of negatively charged nanoplastics to form electrostatic bonds with positively charged metals, leading to their adsorption<sup>77,100</sup>. In a second step, these metal sorbed nanoplastics will be used as building blocks to obtain plastic standards avoiding the extrusion process. The success of this strategy relies on the metal adsorbing properties of the nanoplastics. Following this approach, we describe within this paper the elaboration of polystyrene plastic standards doped with manganese, cobalt, copper, and lead. The first step is the synthesis of carboxylated polystyrene particles used as nanoplastics model materials. Then the sorption properties of the latter allow their labelling leading to the synthesise of metals sorbed nanoplastics model materials. The last step is the elaboration of the plastic standards by melting purified metal sorbed nanoplastics model materials. The homogeneity of the metal distribution inside the plastic standard was verified and calibration curves for the four metals were obtained.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Styrene ( $\geq 99\%$ , CAS 100-42-5), acrylic acid (99%, CAS 79-10-7) and ammonium persulfate (98%, CAS 7727-54-0) were purchased from Aldrich. The aqueous solutions of trace metals were made from the corresponding solid salts  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (99.999%, Aldrich, CAS 13778-31-9),  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $> 96\%$ , Merck, CAS 7773-01-5),  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (99.999%, Alfa, CAS 10099-74-8) and  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 98\%$ , VWR, CAS 7646-79-9). Milli-Q water ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) was supplied by a Millipore water purification system (Merck, Darmstadt, Germany).

### 2.2. Elaboration of metal-doped plastic standards

First, a protocol previously described by our group<sup>81</sup>, was followed to synthesise an aqueous dispersion of polystyrene particles with a surface functionalised by carboxylic groups, used as nanoplastics model materials. The synthesis was performed with a ratio  $[\text{styrene}]/[\text{acrylic acid} + \text{styrene}] = 18\% \text{ }^n/n$ . The sample of spherical morphology exhibits a diameter of  $d_H = 320 \text{ nm}$  with a dispersity of 0.14 and a solid content of  $6.7\% \text{ }^w/w$ . The particles surface contains 45 carboxylic groups per  $\text{nm}^2$ .

For the labelling, four aqueous solutions of metal salts were prepared separately ( $[\text{Mn}^{2+}] = 59 \text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{Co}^{2+}] = 135 \text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}] = 159 \text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{Pb}^{2+}] = 203 \text{ g L}^{-1}$ ). Then, 8 different volumes (from 0 to 1.13 mL for  $\text{Mn}^{2+}$ , and from 0 to 0.27 mL for  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ ) of these solutions were added to 8 different vials containing 25 mL of the previous synthesised dispersion of nanoplastics model materials. The vials were placed for 5 days on an oscillating table (520 rpm, KS 130 basic, IKA) before being purified by 3 centrifugation cycles at 12 000 rpm for 30 min. After each centrifugation, the supernatant was replaced by an equal volume of Milli-Q water and the centrifugation pellet was redispersed by cycles of orbital shaking (10 min, TopMix FB 15024, Fisher Scientific) and sonication (10 min, USC500TH, VWR). Each purified sample was freeze-dried for 48 hours at  $-80^\circ\text{C}$  and 80 Pa (Crios-80, Cryotec) to obtain dried powders. Final plastic standard was typically obtained as the following: 1 g of dried powder was introduced into Teflon mould (diameter 17 mm, thickness 12 mm) before to be placed on a heating press (MIE) at  $180^\circ\text{C}$  for 10 minutes under a pressure of 30 bars.

### 2.3. Metal analysis

The laser ablation system used for this study was an ESI NWR-213 equipped with a Nd:YAG laser at 213 nm wavelength (ESI, Fremont, CA, USA) and a TV2 ablation cell. The ICP-MS detector was an Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japan) mounted with Ni cones. Before coupling the laser, ICP-MS was

tuned in liquid introduction mode using a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  Y, Li, Tl, Ce, and Ba in 2%  $\text{HNO}_3$  and to perform mass calibration. The laser aerosol was transported toward ICP-MS by means of a He flow at  $800 \text{ mL min}^{-1}$ . Then the LA-ICP-MS conditions were optimised using a NIST 612 glass material to maximise the element signal intensity and to obtain an acceptable signal stability ( $\text{RSD} < 10\%$ ). Carbon ( $^{13}\text{C}$ ) was used as an internal standard to correct for any sample heterogeneity since all the samples contain carbon uniformly in their structures. A spot size of  $30 \mu\text{m}$ , fluency of  $16 \text{ J cm}^{-2}$  (energy delivery of 65%) with a scan rate at  $80 \mu\text{m s}^{-1}$  and a 20 Hz pulse frequency were applied.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$  were monitored at 0.01 s as integration time, while  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  and  $^{65}\text{Cu}$  at 0.1 s. The analysis performed consisted of the ablation on a line of 2 or 4 mm long, with 5 or 15 laser scans on the same line. Between each laser scan, the focus on the sample surface was incremented by  $-30 \mu\text{m}$ .

To determine metal concentrations by ICP-MS analysis, the plastic standards were mineralised in a single reaction chamber microwave digestion system (Milestone SCI) at  $230^\circ\text{C}$  and  $1.2 \cdot 10^7 \text{ Pa}$ . ICP-MS analyses were carried out with an Agilent 7900 (Agilent Technologies, Japan) equipped with a collision cell.  $\text{H}_2$  gas was used at a flow rate of  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , to eliminate known interferences for the detection of certain isotopes (indicated between brackets). The following isotopes were monitored:  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  ( $\text{H}_2$ ),  $^{65}\text{Cu}$  ( $\text{H}_2$ ),  $^{206}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$ .

#### 2.4. Nanoplastics model materials characterisations

Hydrodynamic diameters ( $d_H$ ) were determined by a dynamic light scattering (DLS) probe (VascoFlex, Cordouan Technologies). DLS analysis are composed of an average of five measurements of 60s. The average hydrodynamic diameter was determined by fitting a normal distribution to the raw data using the cumulants algorithm.

The amount of carboxylic groups at the nanoplastic surface was determined by titration with a Titrando 888 equipped with stirrer 728 and a combined pH glass electrode (pH: 0 – 14; temperature: 0 –  $80^\circ\text{C}$ ;  $[\text{KCl}] = 3 \text{ mol L}^{-1}$ ). The pH of the dispersions was increased to  $\text{pH} > 11$  with a NaOH solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) before titration with HCl solution ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

#### 2.5. Metal sorption

The metal adsorption constants for nanoplastics model materials were calculated fitting the results with the Freundlich model. The Freundlich isotherm corresponds to:

$$Q_e = K_{ads} * C_{eq}^n \quad \text{Equation 1}$$

with  $Q_e$  the adsorbed metal concentration ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_{ads}$  the Freundlich adsorption constant at the equilibrium,  $C_{eq}$  the concentration of metal at the equilibrium ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and  $n$  the non-linearity coefficient.

### 2.6. Ablation characterisation

Determination of ablated depth was carried out with an optical microscope (DM LM/P, Leica). Plastic standards were cut with a razor blade (GEM) perpendicular to the ablation line to observe on their cross-section. Measurements of ablated depth were done 3 times using ImageJ software.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Trace element enrichment of carboxylated polystyrene particles

A previous study showed that metals in cationic forms interact with the negatively charged surface of nanoplastics<sup>100</sup>. To enable the adsorption of metals by the polystyrene nanoparticles, carboxylated nanoparticles containing high amount of carboxylic groups at the surface were synthesised following the work of Pessoni *et al.*<sup>81</sup>. Carboxylated polystyrene nanoparticles containing 45 carboxylic groups per nm<sup>2</sup> at the surface were obtained and will be named nanoplastics model materials. After purification, the nanoplastics model materials were exposed to aqueous solutions of metal (Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) for 5 days. This exposure time was chosen to favour the surface adsorption of as much metal as possible. Indeed, a previous study<sup>100</sup> that reported the sorption mechanisms of copper salt onto the same kind of nanoplastics model materials showed no significant variation of sorbed metal concentrations after 24h of exposure. After the 5 days of exposure time, all batches were purified by centrifugation cycles. Samples of the 8 batches were analysed by ICP-MS to quantify the enrichment rate of the nanoplastics model materials. Figure 3. 2 reports the concentration of adsorbed metal vs. the concentration of metal in solution. Results show limited adsorption capacity of the carboxylated polystyrene particles probably caused by the saturation of the particles by the four metals. To calculate the adsorption constant, the isotherms were fitted using the Freundlich model (Figure 3. 2 and Table 3. 1).

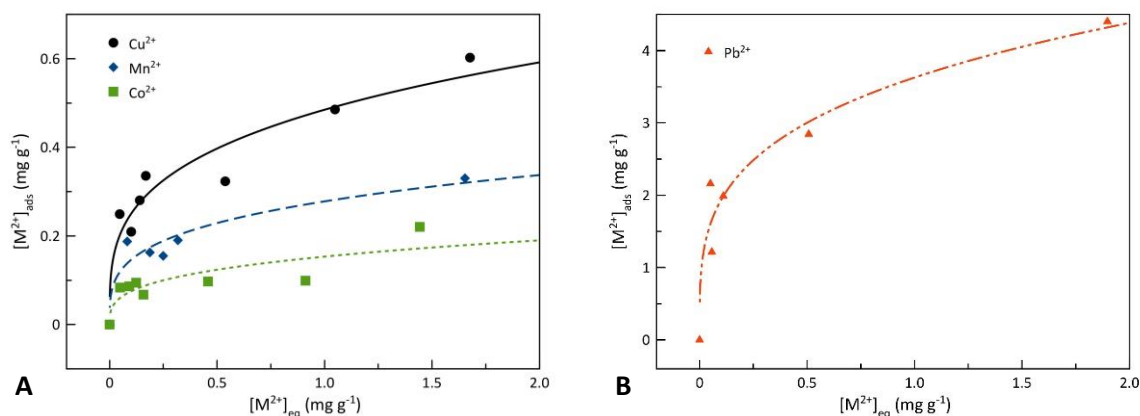


Figure 3. 2: Adsorption isotherms of A) Cu<sup>2+</sup> (black circles), Mn<sup>2+</sup> (blue diamonds), Co<sup>2+</sup> (green squares) and B) Pb<sup>2+</sup> (red triangles) onto carboxylated polystyrene particles fitting with the Freundlich model. Freundlich equation is reported on the experimental part (Equation 1).

The correlation coefficients R<sup>2</sup> are between 0.94 and 0.96 for Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> but is equal to 0.74 for Co<sup>2+</sup>. For Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> the R<sup>2</sup> values indicate that Freundlich model is suitable to describe the sorption processes and correspond to a multilayer sorption onto a heterogeneous surface. The non-linearity coefficients indicate cooperative adsorptions as values are between 0 and 1.

Table 3. 1: Isotherm parameters calculated by fitting the results with the Freundlich model. Freundlich equation is reported on the experimental part (Equation 1).  $K_{ads}$  corresponds to the Freundlich adsorption constant at the equilibrium,  $n$  to the non-linearity coefficient and  $R^2$  to the correlation coefficient (see experimental part, Equation 1).

| Metal     | $K_{ads}$ | $n$  | $R^2$ |
|-----------|-----------|------|-------|
| $Mn^{2+}$ | 0.28      | 0.28 | 0.96  |
| $Co^{2+}$ | 0.15      | 0.31 | 0.74  |
| $Cu^{2+}$ | 0.48      | 0.29 | 0.94  |
| $Pb^{2+}$ | 3.63      | 0.23 | 0.95  |

Results on lead can be compared with the study of Davranche *et al.*<sup>77</sup>. For their study, they used environmental nanoplastics model materials (microplastics exposed to the North Atlantic Gyre, sonicated to obtain nanoplastics) and found a Freundlich adsorption constant at the equilibrium equal to 4.89 with a non-linearity coefficient equal to 0.34. Their adsorption constant is only slightly higher than the value found in our study but stays in the same order of magnitude. This result indicates that our carboxylated polystyrene particles also used in other study as nanoplastics model materials<sup>81,100</sup> are well representative of environmental nanoplastics. This experiment also shows differences in metals' behaviour with a huge adsorption of lead compared to the others.

Knowing the adsorption capacity of these four metals of our carboxylated polystyrene particles, we went a step further to the elaboration of plastic standards. Our metal sorbed carboxylated polystyrene particles were freeze-dried, and the powder was moulded in pellets (Figure 3. 3). To be eligible as plastic standards to calibrate the LA-ICP-MS signal, the metals should be homogeneously dispersed inside the material and this characteristic is detailed in the following.



Figure 3. 3: Image of the microplastic pellets obtained by the moulding of metal sorbed nanoplastics model materials.

### 3.2. Metal dispersion analysis by LA-ICP-MS technique

The LA-ICP-MS analysis consisted of the ablation on a line with several laser scans on the same line (same spot). During one laser scan, the signal can fluctuate due to the inhomogeneity of the ablated mass. This was overcome by normalising the signal by carbon 13, *i.e.* the metal signal at  $t$  time is divided by the carbon 13 signal at the same time, as suggested in literature<sup>174</sup>. Example of raw signals obtained on a plastic pellet is reported in Figure 3. 4. For data processing, the signal mean and standard deviation over one ablation are calculated.

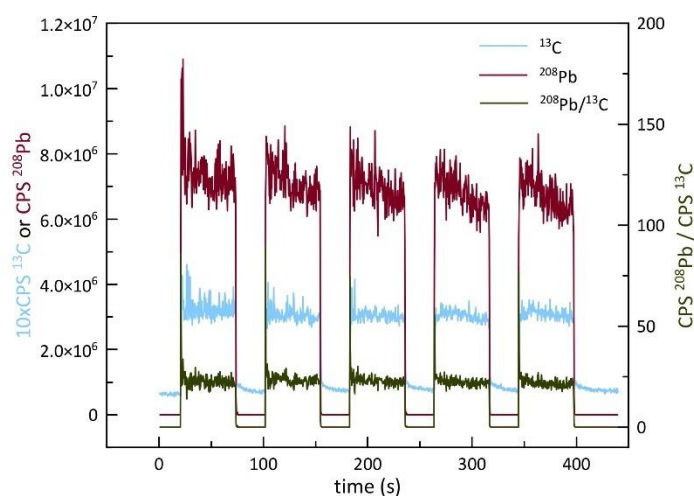


Figure 3. 4: Example of raw signals from  $^{13}\text{C}$  (blue),  $^{208}\text{Pb}$  (red) and  $^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$  (green) obtained during LA-ICP-MS analysis on a microplastic pellet. Signal of  $^{13}\text{C}$  was magnified by a factor of 10.

The calibration curves were recorded before each analysis campaign to take into account any signal drift. It should be noted that the calibration curves were comparable between each campaign. Each point in the calibration curves corresponds to the average of analytical signal recorded during the five laser scans divided by the carbon 13 signal. The homogeneity curves were recorded for copper, with 15 laser scans to check the homogeneity in depth and 5 laser scans for surface homogeneity that was performed in 4 different locations. Between each laser scan, the focus of the laser on the surface was offset by  $-30\ \mu\text{m}$  (value set on the instrument). Optical microscopy was used to check the real ablation depth. After ablation, the pellets were cut perpendicular to the ablation line and the section was imaged. This characterisation was done on 3 plastic pellets of PS sorbed with copper ablated 6, 12 and 18 times at same locations. Figure 3. 5 reports the images in which the real ablation depth was measured (Figure 3. 5B) and shows that the theoretical ablation depth value set on the instrument of  $30\ \mu\text{m}$  is overestimated while plastic is ablated. The mean real ablation depth of  $4.3\ \mu\text{m}$  was estimated by fitting the ablation depth measured by microscopy toward the number of ablation (Figure 3. 5A).

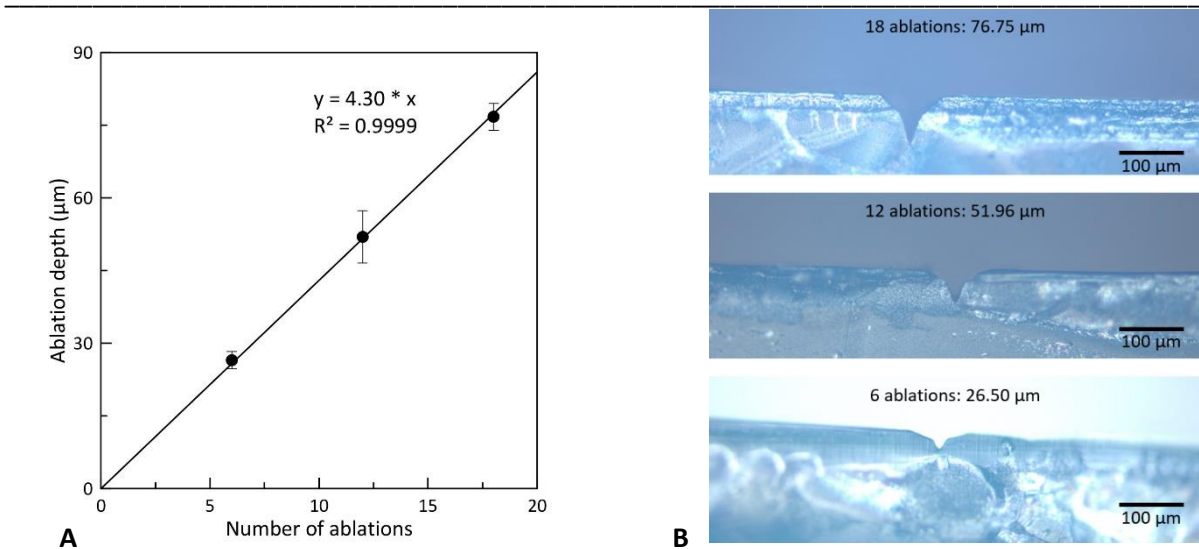


Figure 3. 5: A) Correlation between ablation depth and number of ablations and B) Optical microscopy images of the 3 microplastic pellets of PS sorbed with  $\text{Cu}^{2+}$  ablated 6, 12 and 18 times.

Knowing the real ablation depth, the metal content of a plastic pellet was analysed by LA-ICP-MS at different depths and at various points on the pellet surface. To study the homogeneity of the metal dispersion in depth, the plastic pellet was ablated 15 times on the same line, *i.e.* according to the real ablation depth (4,3  $\mu\text{m}$ ), to a total depth of 64.5  $\mu\text{m}$ .

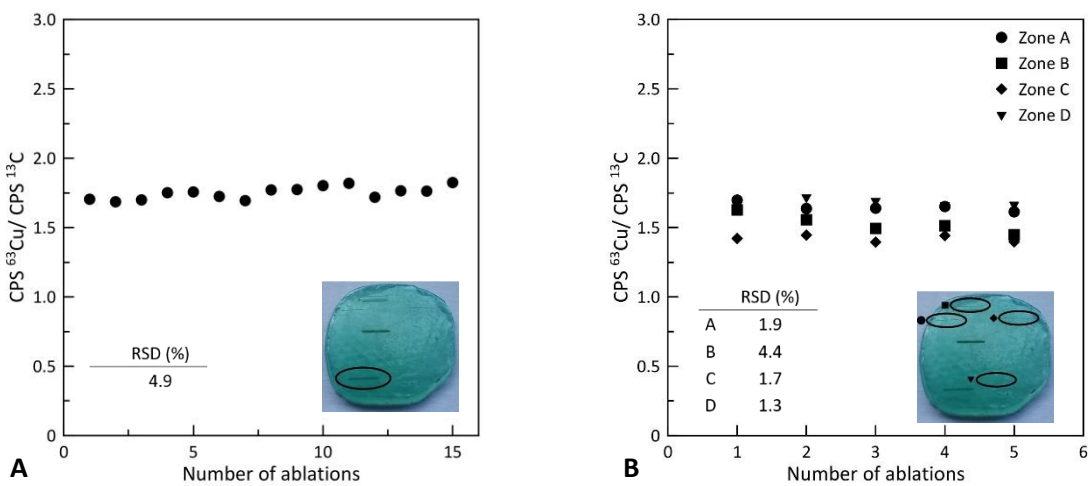


Figure 3. 6: LA-ICP-MS analysis of the metal signal ( $^{63}\text{Cu}$ ) in a microplastic pellet, A) in-depth at one location and B) at 4 different locations.

Figure 3. 6A shows a constant concentration of metal (copper) at all depths. The results confirm the depth homogeneous dispersion of the metal within the plastic pellet. The relative standard deviation (RSD) was calculated by dividing the mean value by the standard deviation and is reported on the Figure 3. 6A. Then, four random locations were chosen on the same plastic pellet and each of them was

ablated by five laser scans. Figure 3. 6B shows again a constant concentration of the metal at all sampled locations. The results confirm the homogeneous dispersion of the metal all over the surface of the plastic pellet. As a conclusion, these results showed the success of our strategy, since the pellet contains a metal homogeneously distributed in depth and at the surface. Therefore, this plastic pellet may be considered as a plastic standard and used for calibration.

Calibrations were then carried out on 5 successive ablations of the surface of all the plastic standards considering the  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  signals. The calibration curves and the RSD values are reported in Figure 3. 7. The metal concentrations (x-axis) were determined by ICP-MS after mineralisation of the samples. All the RSD values are below or close to 6% except for  $\text{Mn}^{2+}$ . Sensitivities are  $0.0119 \text{ mg kg}^{-1} (\text{CPS } ^{55}\text{Mn}/\text{CPS } ^{13}\text{C})^{-1}$ ,  $0.0017 \text{ mg kg}^{-1} (\text{CPS } ^{59}\text{Co}/\text{CPS } ^{13}\text{C})^{-1}$ ,  $0.0005 \text{ mg kg}^{-1} (\text{CPS } ^{63}\text{Cu}/\text{CPS } ^{13}\text{C})^{-1}$  and  $0.0161 \text{ mg kg}^{-1} (\text{CPS } ^{208}\text{Pb}/\text{CPS } ^{13}\text{C})^{-1}$ . The range of linearity depends on the metal and is up to 600 and 4,400  $\text{mg kg}^{-1}$  for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  and is shorter for  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  reaching highest values at 360 and 220  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively. It is worth noticing that the results obtained for  $\text{Mn}^{2+}$  are the one that would require additional analysis for better reliability since two results are out of the linear regression (330 and 366  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Moreover, Figure 3. 7 shows that the results of the plastic standards containing  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  are close and mostly around 174 and 85  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively. This metal content could be understood from the study of adsorption isotherms and the isotherm parameters obtained with Freundlich model (Figure 3. 2 and Table 3. 1), the adsorption capacity of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  being the lowest. As a consequence, plastic standards exhibit similar metal concentration and it is interesting to have a deeper look onto their LA-IPC-MS signals. As example, the 2  $\text{Co}^{2+}$  standards containing 83 and 86  $\text{mg kg}^{-1}$  (results obtained by ICP-MS) give similar signals by LA-IPC-MS analysis (0.161 and 0.164), the same is obtained for the two other  $\text{Co}^{2+}$  standards containing 95 et 97  $\text{mg kg}^{-1}$  with similar LA-IPC-MS signals (0,165 et 0,169). These results showed the good reproducibility of the LA-IPC-MS analysis *i.e.*, two different standards containing the same metal content gives same LA-IPC-MS signal.

In comparison, the results obtained from plastic standards containing  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  took into account 6 pellets containing concentration of metal spread over a wide range of concentration (from 1,700 to 4,400  $\text{mg kg}^{-1}$  for  $\text{Pb}^{2+}$  and 250 to 600  $\text{mg kg}^{-1}$  for  $\text{Cu}^{2+}$ ). The calibration curves reported within Figure 3. 7 is then more robust for these two standards ( $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ). It is worth noticing that we were able to elaborate a plastic standard containing up to 4,400  $\text{mg kg}^{-1}$ , making them good candidates for analysing plastics containing high levels of lead. An overview of metal content in microplastics by Kutralam-Muniasamy *et al.*<sup>163</sup> reported metal concentrations frequently observed in microplastics worldwide.

Mn<sup>2+</sup> is found to be less than 1,000 mg kg<sup>-1</sup>, Co<sup>2+</sup> less than 100 mg kg<sup>-1</sup>, Cu<sup>2+</sup> less than 10,000 mg kg<sup>-1</sup> and Pb<sup>2+</sup> less than 30,000 mg kg<sup>-1</sup>. The plastic standards we propose are in the proper range.

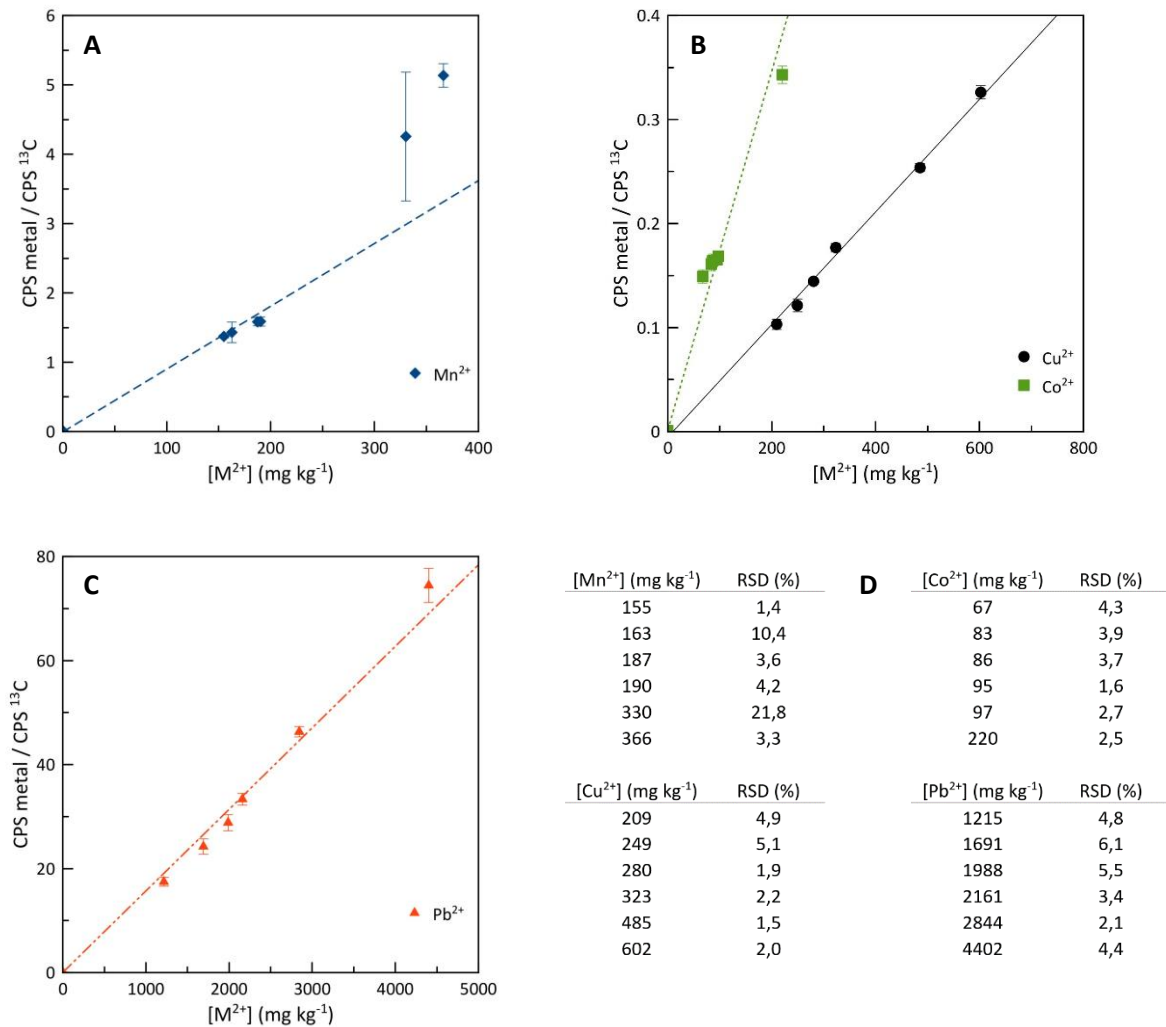


Figure 3. 7: Calibration curves of A) Mn<sup>2+</sup>, B) Co<sup>2+</sup> (green squares) and Cu<sup>2+</sup> (black circles), C) Pb<sup>2+</sup> and D) RSD values.

#### 4. Conclusion

In this study, carboxylated polystyrene particles, used as nanoplastics model materials were chosen to synthesise metal-doped plastic standards. After five days' exposure to various concentration of metals ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), the adsorption capacities of the nanoplastics model materials were characterised. The  $\text{Pb}^{2+}$  adsorption constant was revealed to be 10 times greater than for the other metals ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). These sorbed nanoplastics were moulded to plastic pellets and LA-ICP-MS analysis confirmed the homogeneous dispersion of the metals inside (in depth) and at the surface of the pellets, the latter may thus be assimilated to plastic standards. These plastic standards were analysed by ICP-MS to get their metal total content before to be used to calibrate the LA-ICP-MS signal. Acceptable linear regressions were obtained ( $R^2$  between 0.961 and 0.998), enabling the analytical signal to be converted into metal concentration. Calibration results were compared to the adsorption isotherm and better results were obtained with the metals exhibiting highest isotherm parameters ( $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ), and plastic standard containing metal content as high as 4,400 and 600  $\text{mg kg}^{-1}$  were obtained for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  respectively. The results demonstrate the successful of the process to elaborate ranges of plastic standards and further works should extend the elaboration of plastic standards to other metals than  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  to allow the quantification of the metal adsorption into environmental microplastic samples.





**Chapitre 4 : Microplastiques et biofilms, étude de l'adsorption du  
cobalt en mésocosmes**



## Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introduction.....   | 156 |
| 2. Matériels et méthodes .....   | 158 |
| 2.1. Matériels.....  | 158 |
| 2.1.1. Produits chimiques.....   | 158 |
| 2.1.2. Échantillons de microplastiques.....  | 158 |
| 2.1.3. Instruments analytiques.....  | 158 |
| 2.2. Méthodes .....  | 159 |
| 2.2.1. Expérience en mésocosmes .....  | 159 |
| 2.2.2. Expérience en eau de rivière synthétique.....                               | 162 |
| 2.2.3. Mesure de l'abondance en microorganismes dans les biofilms .....            | 163 |
| 3. Résultats et discussions.....   | 165 |
| 3.1. Quantification du cobalt dans les microplastiques exposés en mésocosmes ..... | 166 |
| 3.1.1. Concentrations totales en cobalt .....                                      | 166 |
| 3.1.2. Profils de concentration du cobalt en profondeur.....                       | 170 |
| 3.2. Caractérisations de la plastisphère .....                                     | 177 |
| 3.3. Impact de la présence de biofilm sur l'adsorption du cobalt.....              | 184 |
| 4. Conclusion .....  | 188 |
| Annexes .....  | 190 |

## 1. Introduction

Comme décrit dans le Chapitre 1, les microplastiques sont capables d'adsorber, d'accumuler et de transporter des polluants métalliques présents dans leurs environnements, notamment dans les environnements aquatiques<sup>158</sup>. Par ailleurs, les microplastiques y sont rapidement colonisés en surface par des organismes vivants qui s'y accumulent avec le temps, formant un biofilm<sup>175</sup>. Ce dernier est composé de plusieurs communautés microbiennes de bactéries, d'algues, de diatomées, de champignons et de protozoaires vivant dans une substance polymérique extracellulaire et formant une couche typiquement verdâtre à la surface des objets<sup>176</sup>. Spécifiquement pour les plastiques, ce biofilm qui colonise leurs surfaces porte le nom de plastisphère<sup>66</sup>. Il a été montré que la présence de cette plastisphère à la surface des plastiques joue un rôle important dans les processus d'adsorption des polluants tels que les métaux<sup>79,175,177-184</sup>.

Dans ce chapitre, nous reportons l'étude de l'adsorption de métaux sur des microplastiques en milieu naturel, plus particulièrement en rivière, nos conditions incluant de fait la formation potentielle de biofilm. Afin de se rapprocher le plus efficacement possible des conditions environnementales, les expériences ont été réalisées en mésocosmes. Ces mésocosmes sont des rivières artificielles (appelées également « rivières pilotes ») dans lesquelles le flux d'eau circulant est détourné du gave de Pau. Ce flux d'eau est donc naturel, aucune filtration ou extraction visant à purifier l'eau pour retirer les organismes vivants par exemple ne sont réalisées. La seule opération effectuée est l'adjonction d'un sel métallique, du cobalt, à différentes concentrations. En parallèle de ces expériences, une étude avec une eau de rivière synthétique a été réalisée, en cherchant à éviter le développement de biofilm sur la surface des échantillons afin de comparer l'adsorption de métaux en présence et en absence de la plastisphère. Le cobalt est un métal d'intérêt prioritaire, il entre dans la composition des batteries de type lithium-ion, avec le lithium, le nickel et le manganèse. Il est donc une source émergente de pollution environnementale qu'il est nécessaire d'évaluer<sup>185</sup>.

Notre étude présente ainsi plusieurs avantages par rapport à celles qui ont déjà été reportées dans la littérature. Tout d'abord, vis-à-vis des travaux étudiant l'influence de la présence de biofilm sur l'accumulation des métaux qui sont réalisés non pas en conditions environnementales mais en laboratoire<sup>180,183,184</sup>. Ces études utilisent de l'eau de rivière ou de mer fraîchement prélevée voire de l'eau modèle préparée en laboratoire, mais ne peuvent pas simuler les paramètres environnementaux comme par exemple les conditions météorologiques ou les variables physico-chimiques qui varient constamment ne serait-ce qu'au cours d'une journée (ensoleillement, température, vent, ...). Nos expériences *in situ* doivent permettre ainsi de mieux comprendre les conséquences de la pollution microplastique sur l'environnement en fournissant un aperçu plus précis de l'influence de toutes les variables environnementales sur les phénomènes d'adsorption des métaux par les microplastiques. Un

autre avantage de nos travaux est que l'adsorption d'un métal est étudiée pendant la formation du biofilm à la surface des microplastiques. Alors que certaines équipes font d'abord croître un biofilm sur leurs échantillons puis dans un second temps étudient les phénomènes d'adsorption<sup>79,178,180,182-184</sup>, notre protocole permet de suivre l'adsorption du cobalt pendant la formation de la plastisphère. Pour être le plus complet possible, notre protocole de suivi en mésocosmes comprend 4 durées d'exposition (de 1 à 4 semaines) et 4 concentrations d'exposition en cobalt (de 0,05 à 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), ces dernières étant étudiées en triplicata. Afin de mettre en évidence le rôle du biofilm dans les phénomènes d'adsorption, une dernière expérience d'exposition a été réalisée en laboratoire sous des conditions contrôlées afin de limiter au maximum le développement bactérien. Cette expérience, réalisée en eau de rivière synthétique a été menée sur les mêmes lots de microplastiques, les mêmes durées d'exposition et avec 3 des 4 concentrations étudiées dans l'expérience en mésocosmes.

D'un point de vue analytique, l'adsorption du cobalt a été étudiée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ainsi que par ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (LA-ICP-MS). L'analyse par ICP-MS a permis de déterminer les concentrations totales en cobalt présentes dans les échantillons avant et après exposition. La LA-ICP-MS a permis de déterminer les profils en profondeur d'adsorption du cobalt. Les biofilms ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (SEM-EDS) et l'abondance en microorganismes dans ces matrices a été quantifiée par quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

#### 2.1.1. Produits chimiques

L'eau MilliQ ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) a été obtenue par un système de purification d'eau Millipore (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Le bicarbonate de sodium ( $\geq 99,7\%$ , CAS 144-55-8), le sulfate de sodium dihydraté ( $\geq 99\%$ , CAS 1010-41-4), le sulfate de magnésium ( $\geq 97\%$ , CAS 7487-88-9), le chlorure de potassium ( $99\%$ , CAS 7447-40-7), l'azoture de sodium ( $\geq 99,5\%$ , CAS 26628-22-8) et l'éthanol ( $99,8\%$ , CAS 64-17-5) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le chlorure de cobalt hexahydraté ( $98\%$ , CAS 7791-13-1) a été acheté chez Fisher Scientific. L'acide nitrique ( $69-70\%$ , CAS 7697-37-2) de grade AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag a été acheté chez VWR. Des pastilles de javel à 44% en chlore actif ont été achetées en grande surface.

#### 2.1.2. Échantillons de microplastiques

Des granulés de microplastiques de 3 polymères différents ont été utilisés dans cette étude (Figure 4. 1) : un polyéthylène haute densité (HDPE) de type HD 2003 SN 53 (Arkema Lacqtene), un polypropylène (PP) de type C765-15NA (Braksem) et un polystyrène (PS) cristal de type 1160 (TotalEnergies).

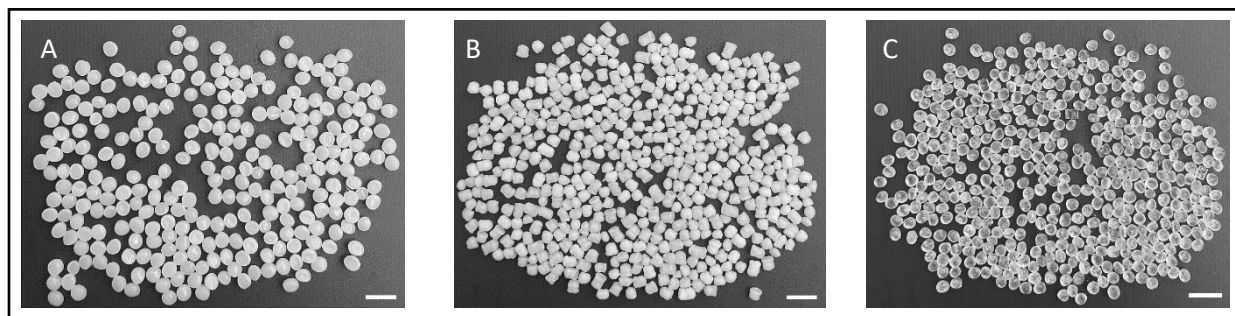


Figure 4. 1 : Photos des microplastiques utilisés dans cette expérience : A) HDPE, B) PP et C) PS. Barres d'échelle 10 mm

#### 2.1.3. Instruments analytiques

Pour déterminer les concentrations totales en cobalt, les échantillons ont été minéralisés dans de l'acide nitrique 70% à une concentration de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  en utilisant un système de digestion par micro-ondes à chambre de réaction unique (Milestone SCI) à  $230^\circ\text{C}$  et  $1,2 \cdot 10^7 \text{ Pa}$  pendant 30 minutes. Ensuite, la quantité totale de cobalt présente dans les échantillons a été déterminée par analyse ICP-MS en mode normal avec un Agilent 7900 (Agilent Technologies, Japon) avec la mesure de l'isotope  $^{59}\text{Co}$ .

Chaque échantillon a été analysé en triplicata. Pour chaque concentration d'exposition, les résultats correspondent à la valeur moyenne des 3 réplicatas de concentration (3 mésocosmes). Les résultats sont donc exprimés sous forme de moyenne de 9 mesures (3 réplicatas de concentration x 3 réplicatas d'analyse). La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont calculées en prenant respectivement 3 et 10 fois l'écart type divisés par la sensibilité.

Les profils en profondeur de sorption du cobalt ont été déterminés par LA-ICP-MS. Le système d'ablation laser utilisé est un ESI NWR-213 équipé d'un laser Nd:YAG d'une longueur d'onde de 213 nm (ESI, Freemont, CA, USA) et d'une cellule d'ablation TV2. L'ICP-MS est un Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japon) monté avec des cônes Ni. Avant de coupler le laser, l'ICP-MS a été réglé en mode d'introduction liquide en utilisant une solution de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Y, Li, Tl, Ce et Ba dans 2% de  $\text{HNO}_3$  et pour effectuer un étalonnage de masse. La poudre ablatée est transportée vers l'ICP-MS au moyen d'un flux d'He à  $800 \text{ mL min}^{-1}$ . Ensuite, les conditions de la LA-ICP-MS ont été optimisées en utilisant un matériau en verre NIST 612 pour maximiser l'intensité du signal de l'élément et pour obtenir une stabilité acceptable du signal ( $\text{RSD} < 10\%$ ). Le carbone ( $^{13}\text{C}$ ) a été utilisé comme étalon interne pour corriger toute hétérogénéité de l'échantillon puisque tous les échantillons contiennent du carbone uniformément dans leur structure. Une taille de spot de  $30 \mu\text{m}$ , une fluence de  $16 \text{ J cm}^{-2}$  (puissance laser de 65%), un taux de balayage de  $80 \mu\text{m s}^{-1}$  et une fréquence d'impulsion de 20 Hz ont été appliqués. Le signal du  $^{13}\text{C}$  a été enregistré avec un temps d'intégration de 0,01 s, tandis que le  $^{59}\text{Co}$  l'a été avec un temps d'intégration de 0,1 s. Les analyses effectuées consistaient en l'ablation sur une ligne de 1,5 mm, avec 1 ou 4 passages de laser sur la même ligne. Entre chaque passage du laser, la focalisation sur la surface de l'échantillon est incrémentée de  $-30 \mu\text{m}$ . Les résultats sont exprimés en CPS (coup par seconde) du  $^{59}\text{Co}$  divisé par les CPS du  $^{13}\text{C}$ .

Les analyses de microscopie électronique à balayage sont réalisées sur un microscope Apreo 2S (ThermoFisher) avec un détecteur d'électron secondaire à une tension de 1 ou 2 kV. Les échantillons de microplastiques ont été métallisés sur 4 nm avec du platine. Les analyses en SEM ont été couplées à un spectroscope à rayon X à dispersion d'énergie (XFlash 6|100, Bruker) fonctionnant à une tension d'accélération de 10 kV afin de déterminer la composition élémentaire des parties analysées.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Expérience en mésocosmes

Cette expérience a été réalisée aux rivières pilotes du PERL (Pôle d'Etudes et de Recherches de Lacq), installations de TotalEnergies<sup>186,187</sup> du 12/10/2021 au 09/11/2021. Un schéma de ces installations (issu de la publication de Sourisseau *et al.*<sup>187</sup>) est reporté dans la Figure 4. 2.

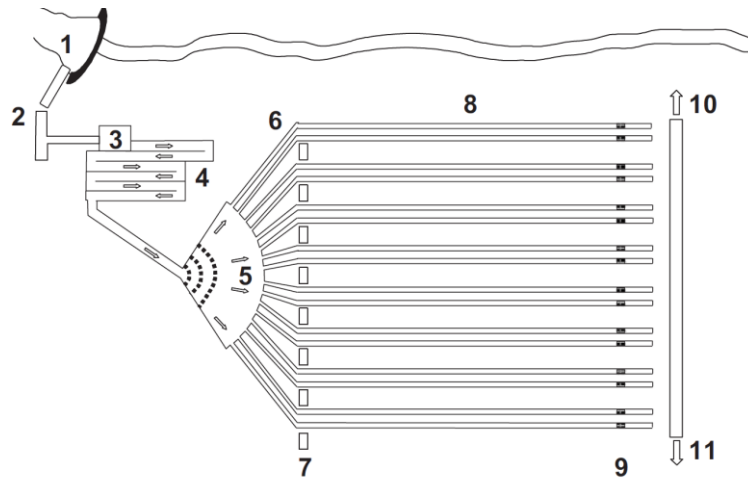


Figure 4. 2 : Schéma de l'installation des rivières pilotes du PERL à Lacq, France. (1) barrage, (2) débitmètre, (3) contrôle du débit, (4) « nurserie », (5) ouvrage de distribution de l'eau, (6) surverses amont, (7) pompes d'injection, (8) rivières pilotes, (9) sondes physico-chimiques, (10) et (11) surverses aval. Les flèches indiquent la direction de l'écoulement de l'eau.

Schéma issu de Sourisseau *et al.*<sup>187</sup>

Les mésocosmes sont situés à l'extérieur et donc exposés aux variations naturelles et sont alimentés par gravité avec de l'eau douce qui n'est ni filtrée ni traitée et qui provient d'un réservoir sur le gage de Pau (barrage d'Artix). Chaque mésocosme est constitué d'un canal en béton de 10 m<sup>3</sup> (40 m de long, 50 cm de largeur et 50 cm de profondeur) dans lequel le temps de séjour de l'eau est d'environ 40 s (vitesse moyenne de l'eau : 1,04 m s<sup>-1</sup>). Avant d'entrer dans les canaux, l'eau circule dans un canal en béton de 88 m de long où des organismes aquatiques se développent (« nurserie ») et d'où ils peuvent coloniser les mésocosmes par dérive. L'homogénéité de l'alimentation en eau des différents mésocosmes est assurée par une structure en béton en forme d'éventail qui a été conçue pour fournir un débit identique dans chaque mésocosme. Les mésocosmes sont au nombre de 16 et numérotés de 1 à 16. Chaque mésocosme est équipé de capteurs en aval permettant l'analyse des paramètres suivants : température, pH, conductivité, taux d'oxygène et alcalinité. Durant l'expérience, les caractéristiques de l'eau sont : une température de 12,6 +/- 1,5°C ; un pH de 8,3 +/- 0,1 ; une conductivité de 268,5 +/- 8 µS cm<sup>-1</sup>, un taux de dioxygène de 11,1 +/- 0,5 (saturation de 105 +/- 1,5%) et une alcalinité de 143 +/- 4 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

En amont des mésocosmes, l'eau est adjuvée de CoCl<sub>2</sub> à 4 concentrations différentes : 0,05 ; 6 ; 30 et 60 µg L<sup>-1</sup>. Les concentrations sont étudiées en triplicata, c'est-à-dire que chaque concentration est retrouvée dans 3 mésocosmes différents. Le Tableau 4. 1 reporte la correspondance du numéro du mésocosme et de la concentration en cobalt y circulant. Des analyses en ICP-MS sont réalisées régulièrement afin de suivre les concentrations en cobalt, les données sont reportées en Annexe 1.

Tableau 4. 1 : Correspondance du numéro du mésocosme et des concentrations d'exposition en cobalt

| [Co] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 0,05     | 6         | 30      | 60        |
|-------------------------------|----------|-----------|---------|-----------|
| Numéro du mésocosme           | 6, 8, 14 | 5, 10, 15 | 2, 3, 9 | 7, 11, 12 |

Pour être maintenus dans le milieu d'étude, les granulés de microplastiques ont été placés dans des sachets de thé en nylon (dimensions : 7 x 6 cm, mailles de 200 x 150  $\mu\text{m}$ ), au nombre de 50 par sachet, chaque type de polymère étant placé dans un sachet distinct. Ces sachets ont ensuite été fermés en réalisant une couture puis accrochés par 4 (un de chaque type de polymère) à un fil en nylon. Ces cordons de sachets ont ensuite été fixés dans des boîtes en plastique en PP (dimensions : L33 x l24 x H16 cm). Cinq cordons ont été introduits dans chaque boîte. Les boîtes en plastique ont été préalablement perforées d'un côté et le côté opposé a été découpé sur un rectangle de 12 x 9 cm afin de permettre la circulation du flux d'eau. Après perforation et découpe des boîtes, celles-ci ont été rincées à l'eau distillée afin de retirer tous résidus de plastique et séchées à l'air libre. Ces boîtes contenant les échantillons de microplastiques ont ensuite été placées dans les mésocosmes et des galets ont été placés sur celles-ci afin de les maintenir immergées dans le milieu.

Les prélèvements de microplastiques ont lieu tous les 7 jours dans les 12 mésocosmes pendant 4 semaines. Ainsi, le 5<sup>ème</sup> cordon de sachets est une sécurité en cas de perte d'un des 4 cordons au cours de l'expérience. Lors de chaque prélèvement, les cordons de sachets contenant les microplastiques sont conservés à froid dans une glacière ( $\sim 12^\circ\text{C}$ ) et transportés au laboratoire. Les sachets sont ensuite ouverts, et une dizaine de granulés de microplastiques est introduit dans des tubes Eppendorf puis stocké immédiatement à  $-80^\circ\text{C}$ . Le reste des granulés (une quarantaine) est rincé plusieurs fois à l'eau MilliQ à travers le sachet, transféré dans des tubes en plastique puis séché aux micro-ondes (200W pendant 1h20, Microwave Reaction System SOLV, Anton Paar) avant d'être stocké à  $4^\circ\text{C}$ . Les granulés de microplastiques stockés à  $-80^\circ\text{C}$  sont destinés aux analyses d'abondance de microorganismes et ceux rincés, séchés et stockés à  $4^\circ\text{C}$  sont destinés aux quantifications des concentrations en cobalt. La Figure 4. 3 présente quelques illustrations de l'expérience.

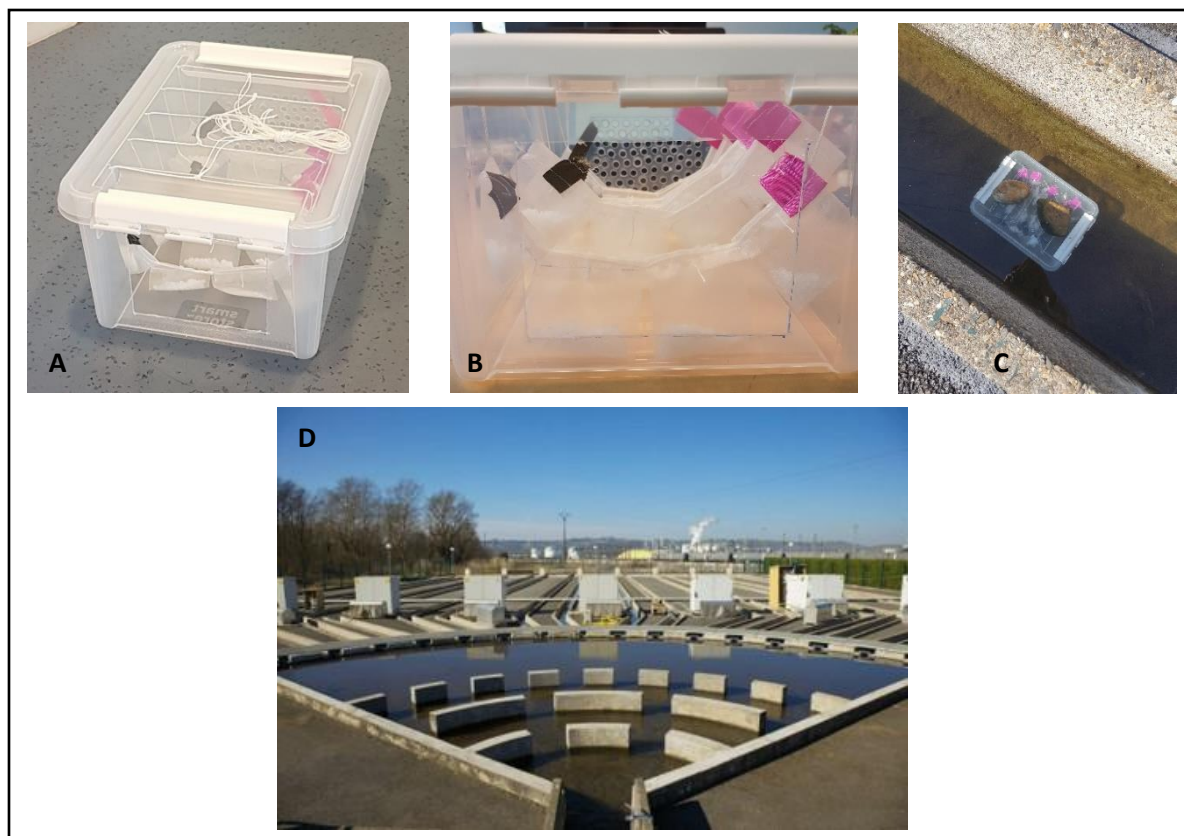


Figure 4. 3 : Expériences en mésocosmes, A) et B) boîte en plastique contenant les cordons de microplastiques, C) boîte contenant les échantillons placée dans un mésocosme et D) mésocosmes

### 2.2.2. Expérience en eau de rivière synthétique

Cette expérience a été menée à 3 concentrations en cobalt : 0 ; 6 et 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  avec les 3 polymères (HDPE, PP et PS) et sur 4 durées d'exposition : 7 ; 14 ; 21 et 28 jours. La composition de l'eau de rivière synthétique est :  $[\text{NaHCO}_3] = 192 \text{ mg L}^{-1}$  ;  $[\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 120 \text{ mg L}^{-1}$  ;  $[\text{MgSO}_4] = 120 \text{ mg L}^{-1}$  et  $[\text{KCl}] = 8 \text{ mg L}^{-1}$  avec un pH compris entre 7,6 et 8,0 et une alcalinité comprise entre 110 et 120  $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  selon l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA)<sup>188</sup>. Dans un premier temps, l'eau contenant les sels  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{KCl}$  a été préparée dans des flacons préalablement nettoyés à l'acide nitrique 2% puis autoclavée (15 min, 121°C, Selecta MED 20). Pour cette partie du protocole et afin de limiter le développement bactérien, de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), un biocide, est ajouté à une concentration de 0,1  $\text{g L}^{-1}$  à cette eau de rivière synthétique. Le  $\text{NaHCO}_3$ , le  $\text{NaN}_3$  et le  $\text{CoCl}_2$  ne pouvant être autoclavés, des solutions mères de  $\text{NaHCO}_3$  à 35  $\text{g L}^{-1}$ , de  $\text{NaN}_3$  à 18  $\text{g L}^{-1}$  et de  $\text{CoCl}_2$  à 1,08  $\text{g L}^{-1}$  ont été préparées dans des flacons nettoyés à l'acide nitrique 2% avant d'être filtrées à l'aide d'un filtre 0,1  $\mu\text{m}$  (filtre seringue stérile Pall Acrodisc membrane Supor).

3 boîtes en plastique en PP ont été désinfectées avec de l'eau de Javel à 0,5% (w/w), rincées puis séchées à l'air libre sous une hotte stérile à flux laminaire et complétées de 1,8 L d'eau de rivière synthétique, 10 mL de solution de NaHCO<sub>3</sub> et 10 mL de solution de NaN<sub>3</sub> à l'aide de micropipettes dont les tips ont été autoclavés. Dans chaque boîte (une boîte par concentration), la solution de CoCl<sub>2</sub> a été ajoutée à hauteur de 0, 1 ou 10 mL afin d'atteindre les concentrations en cobalt de 0, 6 ou 60 µg L<sup>-1</sup>, respectivement. Ces boîtes contenant les milieux d'étude à 3 concentrations en cobalt différentes ont été placées sous un rayonnement UV dans une hotte stérile pendant 15 minutes avant l'ajout des échantillons de microplastiques.

20 granulés de microplastiques sont introduits par sachet de thé en nylon et par type de polymère. Des cordons de 3 sachets renfermant chacun un type de polymère distinct sont noués à des tubes en PVC préalablement autoclavés et l'ensemble est placé sous un rayonnement UV dans une hotte stérile pendant 15 minutes avant d'être introduit dans les milieux d'exposition. Toutes ces manipulations ont été réalisées en portant des gants en nitrile préalablement rincés à l'éthanol.

Les prélèvements ont eu lieu tous les 7 jours pendant 28 jours. Les prélèvements ont été réalisés en retirant un tube PVC de chaque boîte à l'aide d'une pince stérile. Les granulés de microplastiques sont rincés plusieurs fois à l'eau MilliQ à travers le sachet, transférés dans des tubes en plastique puis séchés aux micro-ondes (200W pendant 1h20, Microwave Reaction System SOLV, Anton Paar) avant d'être stockés à 4°C.

### 2.2.3. Mesure de l'abondance en microorganismes dans les biofilms

Pour déterminer l'abondance en microorganismes formant les biofilms sur les microplastiques ayant séjournés en mésocosmes, l'approche de biologie moléculaire de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative (qPCR) a été utilisée. Cette technique permet d'estimer l'abondance microbienne à l'aide d'un marqueur moléculaire, le gène de l'ADNr 16S (procaryote) ou 18S (eucaryote), gène universel chez tous les êtres vivants. Une quantification absolue de ce gène permet d'estimer le nombre de microorganismes procaryote et eucaryote. Une étape préalable d'extraction d'ADN est nécessaire. L'extraction a été réalisée sur 9 granulés de chaque type de microplastique (HDPE, PP et PS) à l'aide du kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Allemagne) conformément aux directives du protocole du kit. L'ADN a été quantifié à l'aide du kit QUBIT dsDNA haute sensibilité (HS) (ThermoFisher Scientific, Oregon, USA). La qPCR a ensuite été réalisée à l'aide du kit DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR (Finnzyme) avec 0,8 µM d'amorces bac1055F et bac1392R<sup>189</sup> pour la quantification du gène de l'ADNr 16S et V8\_1422F et V9\_1510R<sup>190</sup> pour le gène de l'ADNr18S et entre 0,015 et 0,426 ng d'ADN extrait dans un volume final de 20 µL. La qPCR a été réalisée avec une dénaturation initiale de 7 min à 95°C,

suivie de 40 cycles de 10 sec à 95°C et 20 sec à 60°C. La quantification du nombre de copies a été réalisée avec une gamme étalon, constituée d'un fragment d'un gène d'ADNr 16S ou d'ADNr 18S cloné dans un plasmide pCR 2.1-TOPO, en suivant le protocole décrit par Paissé *et al.*<sup>191</sup>. L'efficacité de la PCR spécifique de chaque couple d'amorce était de 101% pour l'amplification de l'ADNr 16S et 90% pour l'ADNr 18S.

### 3. Résultats et discussions

Avant de présenter les résultats obtenus au cours des différentes expériences et caractérisations, il est nécessaire de discuter des microplastiques utilisés dans cette étude. Il s'agit de granulés de microplastiques destinés à la production, à l'échelle industrielle, d'emballages de produits d'hygiène, chimique, pharmaceutique et alimentaire. Ces granulés présentent des formes plutôt cylindriques (PP), sphériques (PS) et « sphériques aplaties » (HDPE). Bien que leurs dimensions soient du même ordre de grandeur, leurs formes et leurs dimensions restent irrégulières et variables. Sur des lots d'environ 300 granulés, les diamètres de Feret de chaque type de polymère ont été mesurés par reconnaissance d'image (Image J) et sont présentés dans un histogramme de fréquence (Figure 4. 4).

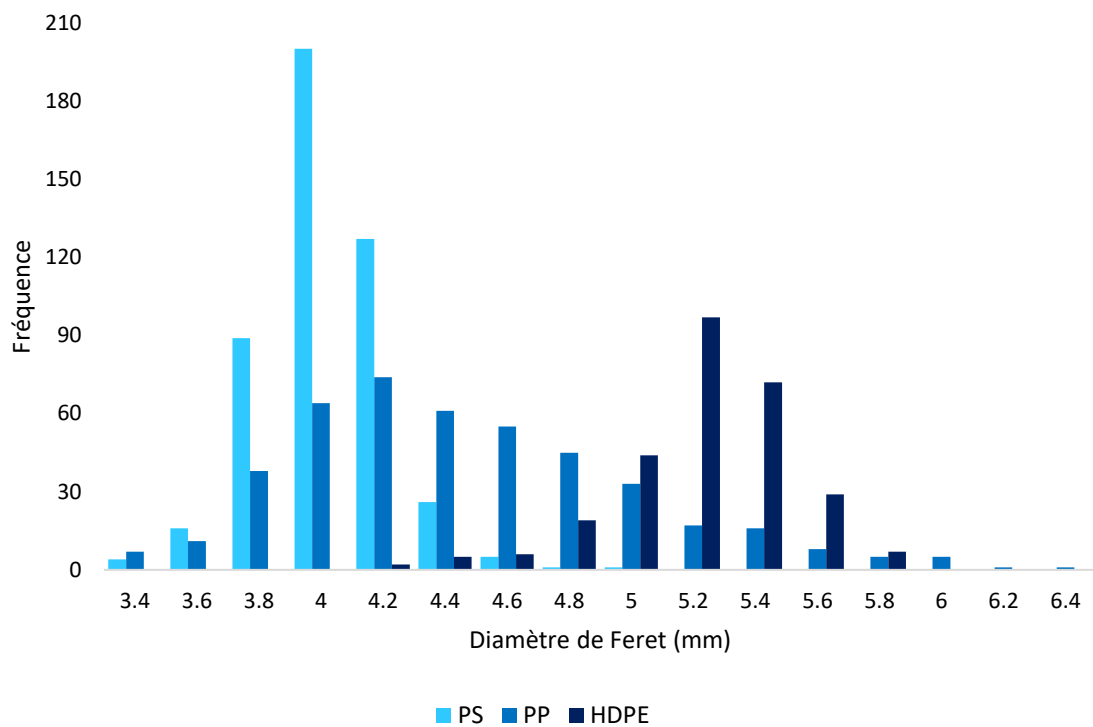


Figure 4. 4 : Diagramme de fréquence des diamètres de Feret d'environ 300 granulés des microplastiques utilisés dans cette étude (bleu ciel : PS, bleu : PP et bleu marine : HDPE)

Les microplastiques de PS sont ceux qui présentent les dimensions moyennes les plus faibles, suivis des PP puis des HDPE. Ainsi les diamètres de Feret moyens pour chacun de ces types de microplastiques sont 3,9 ; 4,3 et 5,0 cm respectivement. Par ailleurs, les diamètres de Feret des PP sont les plus dispersés, ceci peut être confirmé par les résultats des facteurs d'anisotropie calculés en faisant le rapport des diamètres de Feret maximum et minimum des granulés. Les microplastiques de PS, PP et HDPE ont respectivement des facteurs d'anisotropie de 1,15 ; 1,21 et 1,15.

### 3.1. Quantification du cobalt dans les microplastiques exposés en mésocosmes

#### 3.1.1. Concentrations totales en cobalt

Avant de débiter cette étude, l'absence de cobalt dans les microplastiques avant exposition a été vérifiée. Les résultats sont reportés dans le Tableau 4. 2. Les valeurs de LOD et de LOQ correspondant à la calibration du signal du cobalt sont données en coup par seconde (CPS), qui correspond au signal analytique brut ainsi qu'en concentration en cobalt après application de l'équation obtenue lors de la calibration du signal. Les LOD et LOQ sont données avec ces deux unités afin de rendre compte de la faiblesse du signal obtenu sur les échantillons de microplastiques avant exposition. Ainsi, le signal sur ces microplastiques est près de 9 fois à plus de 60 fois inférieur au signal analytique correspondant à la LOD. Les échantillons de microplastiques avant exposition sont donc considérés exempts de cobalt.

Tableau 4. 2 : LOD et LOQ du signal analytique en ICP-MS du cobalt en CPS et en concentration en cobalt et analyses des échantillons de microplastiques avant exposition en mésocosmes

|            | CPS     | [Co] (mg kg <sup>-1</sup> ) |             | CPS    |
|------------|---------|-----------------------------|-------------|--------|
| <b>LOD</b> | 124 000 | 0,2                         | <b>HDPE</b> | 2 700  |
| <b>LOQ</b> | 412 000 | 0,8                         | <b>PP</b>   | 14 300 |
|            |         |                             | <b>PS</b>   | 2 000  |

Concernant les échantillons de microplastiques exposés en mésocosmes aucune fragmentation macroscopique n'est visible, comme illustré dans la Figure 4. 5.

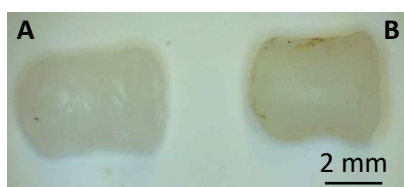


Figure 4. 5 : Photographie d'un granulé de microplastique type PP A) avant exposition et B) après exposition en mésocosmes pendant 28 jours

Dans une première approche, seuls les microplastiques exposés à la plus forte concentration en cobalt (60 µg L<sup>-1</sup>) et au temps le plus long (28 jours) ont été analysés par ICP-MS pour quantifier le cobalt sorbé. Les résultats sur les 3 mésocosmes concernés (7, 11 et 12) sont reportés dans le Tableau 4. 3.

Tableau 4. 3 : Concentrations totales en cobalt déterminées par ICP-MS dans les échantillons de microplastiques exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  en fonction du numéro du mésocosme

| mésocosme         | [Co] ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |      |      |
|-------------------|------------------------------|------|------|
|                   | PP                           | PS   | HDPE |
| 7                 | 51,8                         | 45,5 | 33,8 |
| 11                | 50,8                         | 47,0 | 31,3 |
| 12                | 22,2                         | 25,2 | 26,6 |
| <b>Moyenne</b>    | 41,6                         | 39,2 | 30,6 |
| <b>Ecart-type</b> | 16,8                         | 12,2 | 3,7  |

Tous les échantillons contiennent ainsi du cobalt après 28 jours d'exposition quel que soit le type de polymère, avec des concentrations moyennes dépassant de près de 40 fois la LOQ ( $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de la technique analytique. Plus précisément, les analyses montrent une adsorption similaire entre le PP et le PS (respectivement  $41,6$  et  $39,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) et plus élevée que pour le PE ( $30,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La comparaison des mésocosmes montre que les concentrations en cobalt retrouvées dans les microplastiques des mésocosmes 7 et 11 sont assez proches (écart de  $2,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) mais que le mésocosme 12 s'écarte de la moyenne des deux premiers mésocosmes avec une concentration moyenne en cobalt 25% inférieure. Cette disparité ne peut être due à une concentration en cobalt inférieure dans le mésocosme 12, ainsi que l'ont confirmé les analyses de contrôle des concentrations en cobalt dans les mésocosmes réalisées au cours de l'expérience (Tableau 4. 4). En effet, en moyenne durant l'étude, les concentrations en cobalt dans les 3 mésocosmes sont de  $64,8$  (mésocosme 7),  $66,1$  (mésocosme 11) et  $64,6$  (mésocosme 12)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , soit des valeurs comparables.

Tableau 4. 4 : Concentrations en cobalt déterminées par ICP-MS dans les mésocosmes (M) 7, 11 et 12 en fonction du temps

| temps (j)         | [Co] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |      |      |
|-------------------|-------------------------------|------|------|
|                   | M7                            | M11  | M12  |
| 1                 | 66,5                          | 60,0 | 63,9 |
| 3                 | 58,8                          | 61,0 | 60,1 |
| 7                 | 70,3                          | 70,0 | 69,3 |
| 14                | 61,8                          | 65,7 | 62,0 |
| 21                | 68,1                          | 71,5 | 67,7 |
| 28                | 63,5                          | 68,2 | 64,4 |
| <b>Moyenne</b>    | 64,8                          | 66,1 | 64,6 |
| <b>Ecart-type</b> | 4,3                           | 4,7  | 3,4  |

L'origine de cet écart observé dans le mésocosme 12 ne peut pas non plus être liée à l'hétérogénéité des microplastiques engagés. Par exemple, si les microplastiques du mésocosme 12 avaient une surface plus petite, l'adsorption, qui est un phénomène lié aux interfaces, serait moins importante. Cependant, pour éviter tout biais lié à cet aspect, l'expérience a été réalisée sur 50 granulés de microplastiques pour chaque concentration et durée d'exposition. Par ailleurs, les analyses des concentrations totales en cobalt dans les échantillons ont été réalisées après minéralisation de 10 granulés de microplastiques qui ont été choisis aléatoirement parmi les 50. Cette différence pourrait alors représenter la variance qui peut être observée dans l'environnement dont les différences de conditions expérimentales ne sont pas perceptibles macroscopiquement.

Cette observation est en accord avec des études qui ont montré une forte dépendance de l'adsorption des métaux par des microplastiques en fonction des conditions environnementales. Par exemple, Richard *et al.*<sup>179</sup> ont montré une interaction significative entre l'adsorption de cobalt dans des échantillons de HDPE et de PLA et les lieux où les expériences se déroulent. Cela implique que des variations environnementales telles que le pH, la température, la salinité et les concentrations en ligands organiques dissous entre les lieux d'échantillonnage peuvent fortement influencer les résultats des expériences. Dans notre expérience, les lieux d'échantillonnages sont certes très proches et le milieu d'étude provient de la même source mais l'ensoleillement par exemple, peut jouer un rôle important dans la variance des caractéristiques physico-chimiques des différents mésocosmes. Les travaux de Forero-Lopez *et al.*<sup>175</sup> qui ont consisté à étudier l'adsorption de 6 métaux dans des échantillons de microplastiques types PS et nylon pendant 129 jours dans un estuaire (placés en même temps à un seul endroit) a montré des écarts-types sur les valeurs de concentrations en métaux

retrouvées dans leurs échantillons très importants. Sur 12 analyses (6 métaux x 2 matériaux), 4 analyses ont des écarts-types largement supérieurs à la valeur moyenne de la mesure (de 1,3 à 2,3 fois supérieurs), 4 analyses ont des écarts-types de l'ordre de 80 à 90% de la valeur moyenne et 4 analyses ont des écarts-types de l'ordre de la moitié de la valeur moyenne.

À partir des premiers résultats obtenus sur les 3 polymères exposés 28 jours en mésocosmes et à la plus forte concentration en cobalt (Tableau 4. 3), nous avons choisi d'étudier l'effet de la durée d'exposition ainsi que de la concentration d'exposition en cobalt sur le matériau présentant la plus forte valeur d'adsorption, le PP (Figure 4. 6).

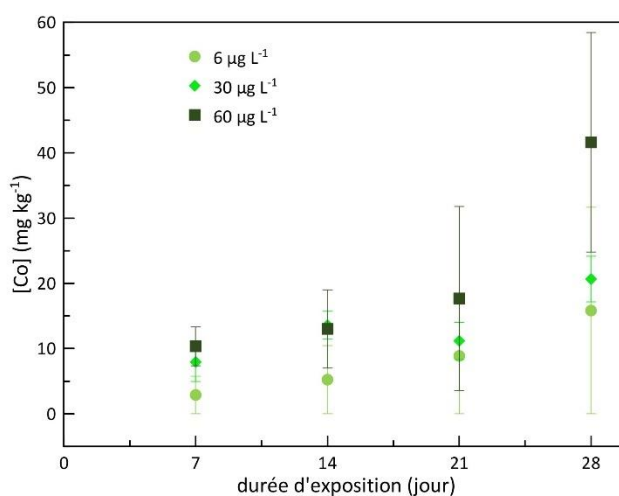


Figure 4. 6 : Concentrations totales en cobalt déterminées par ICP-MS dans les échantillons de PP exposés en mésocosmes à une concentration en cobalt de 6 (ronds vert clair), 30 (losanges verts) et 60 (carrés vert foncé) µg L<sup>-1</sup> en fonction de la durée d'exposition

Les analyses de concentrations totales en cobalt des échantillons exposés à une concentration en cobalt de 0,05 µg L<sup>-1</sup> ont toutes été inférieures à la LOD (de 3 à 8 fois inférieures) et ne sont pas reportées dans la Figure 4. 6. Les concentrations en cobalt retrouvées dans les échantillons de PP augmentent à la fois avec la durée d'exposition et avec la concentration d'exposition. À une concentration d'exposition de 6 µg L<sup>-1</sup>, l'adsorption est de 2,9 (7 jours) ; 5,2 (14 jours) ; 8,9 (21 jours) et 15,8 (28 jours) mg kg<sup>-1</sup> quand, pour une concentration d'exposition de 30 µg L<sup>-1</sup>, elle est de 7,9 ; 13,6 ; 11,2 et 20,7 mg kg<sup>-1</sup> aux mêmes durées d'exposition. À une concentration de cobalt de 30 µg L<sup>-1</sup>, une légère diminution de la concentration moyenne en cobalt retrouvée dans les échantillons est observée entre 14 et 21 jours mais cette différence est comprise dans les écarts-types des mesures. Quant à la concentration d'exposition en cobalt la plus forte, 60 µg L<sup>-1</sup>, les concentrations en cobalt retrouvées dans les échantillons sont de 10,3 (7 jours) ; 13,0 (14 jours) ; 17,7 (21 jours) et 41,6 (28 jours) mg kg<sup>-1</sup>. Ainsi, quelles que soient les concentrations d'exposition en cobalt, les quantités de cobalt adsorbées

sont d'autant plus proches que le temps d'exposition est court. C'est à partir de 28 jours d'exposition que l'influence de la concentration d'exposition sur la quantité adsorbée est la plus marquée, avec une concentration en cobalt analysée dans les échantillons exposés à  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobalt 2 fois supérieure ( $41,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) par rapport aux concentrations d'exposition de 6 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (respectivement 15,8 et  $20,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Par ailleurs, les tendances des points expérimentaux pour les 3 concentrations d'exposition montrent des évolutions différentes. Les valeurs de cobalt adsorbé aux concentrations de 6 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction des temps d'exposition peuvent être ajustés par une régression linéaire (coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,94 et 0,73 respectivement) tandis que les résultats des expositions à  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobalt en fonction de la durée d'exposition correspondent plus à un ajustement exponentiel ( $R^2$  de 0,92). Dans les conditions d'exposition (concentration et durée), aucun de ces résultats ne convergent vers un plateau. Il serait de fait intéressant de poursuivre ce protocole avec des temps d'exposition plus longs afin de confirmer les tendances observées et de caractériser la capacité d'adsorption maximale du PP.

Pour effectuer une comparaison avec les données de la littérature, on peut s'intéresser aux travaux réalisés par Guan *et al.*<sup>79</sup> qui ont étudié l'adsorption du cobalt dans des échantillons de PS expansés. Ils ont étudié les cinétiques d'adsorption du cobalt à une concentration d'exposition de  $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$ , soit près de 17 fois plus concentrée que notre étude. Dans leur cas, l'équilibre d'adsorption a été atteint en 24h ( $Q_e = 120 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Liu *et al.*<sup>178</sup> ont également rapporté des équilibres d'adsorption atteints très rapidement, de l'ordre de 12h sur du PP et du PET exposés à des concentrations de  $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$  en Zn, Cd, Pb. Ces études montrent que les microplastiques peuvent être saturés sur des temps très courts (< 24h) par les métaux quand ils sont exposés à une forte concentration. Des travaux précédents menés au sein de notre laboratoire<sup>100</sup> montrent qu'aux temps courts et à forte concentration d'exposition, c'est préférentiellement la surface des débris plastiques qui est saturée, puis au court du temps, des phénomènes de diffusion s'opèrent et les métaux entrent au cœur des débris. Afin d'aller plus loin dans l'analyse de la sorption du cobalt dans notre étude menée à des concentrations d'exposition plus faibles mais sur des temps plus longs (jusqu'à 28 jours), des analyses en LA-ICP-MS ont été réalisées afin de caractériser les profils de concentration du cobalt en profondeur dans les échantillons de microplastiques.

### 3.1.2. Profils de concentration du cobalt en profondeur

Pour déterminer les profils de concentration du cobalt en profondeur, la technique de la LA-ICP-MS a été utilisée. Comme expliqué dans la partie Matériels et méthodes, le signal obtenu pour le cobalt 59 est normalisé par le signal du carbone 13 obtenu en même temps. Cette normalisation vise à tenir

compte d'une éventuelle inhomogénéité de matière ablatée et est bien documentée dans la littérature<sup>174</sup>. Un exemple de signaux enregistrés au cours de l'ablation est reporté dans la Figure 4. 7. Comme observé, les signaux du carbone 13 et du cobalt 59 enregistrés sur ces échantillons sont très fluctuants au cours d'une ablation ce qui était beaucoup moins le cas sur les étalons de plastique développé au Chapitre 3. Ces fluctuations peuvent être liées aux surfaces inhomogènes de ces échantillons de microplastiques qui présentent des aspérités de surface ainsi qu'une forme arrondie et non plane.

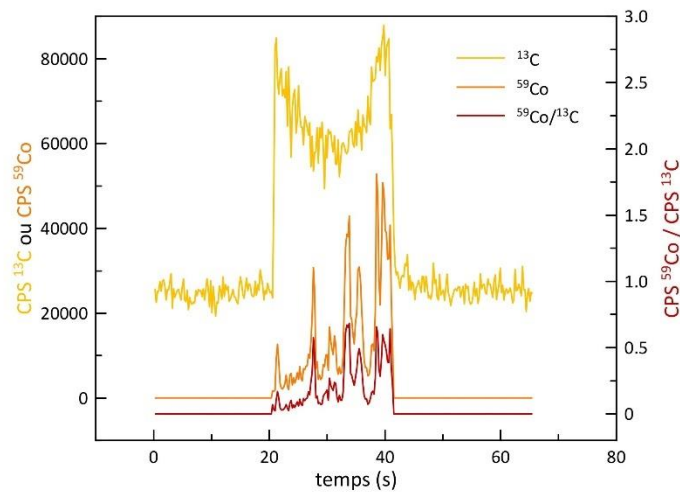


Figure 4. 7 : Exemples de signaux bruts du  $^{13}\text{C}$  (jaune),  $^{59}\text{Co}$  (orange) et  $^{59}\text{Co}/^{13}\text{C}$  (rouge) obtenus au cours d'une analyse en LA-ICP-MS. Ces signaux ont été obtenus sur un PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$

Ainsi, lors du traitement de données, la valeur du signal sur toute l'ablation a été moyennée, mais les valeurs d'écart-types ne se détachant pas de la valeur moyenne du signal, pour la suite, seules les valeurs moyennées seront discutées qualitativement.

Comme pour la quantification du cobalt total dans les échantillons, les premières analyses réalisées en LA-ICP-MS l'ont été sur les échantillons exposés le plus longtemps en mésocosmes (28 jours) et exposés à la plus forte concentration en cobalt ( $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La Figure 4. 8 reporte les résultats en CPS du signal du cobalt 59 normalisé par les CPS du signal du carbone 13 en fonction du nombre d'ablations effectuées au même endroit.

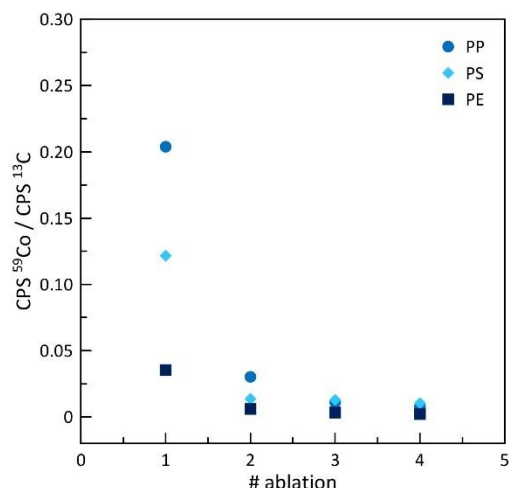


Figure 4. 8 : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP (ronds bleus), PS (losanges bleu ciel) et PE (carrés bleu marine) exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction du nombre d'ablations

La profondeur à laquelle a lieu l'analyse dans l'échantillon étant proportionnelle au nombre d'ablations, les résultats mettent en évidence des teneurs en cobalt plus élevées en surface des échantillons avec une décroissance rapide de la réponse analytique dès la seconde ablation. Dans nos conditions d'exposition, le cobalt ne semble pas pénétrer le microplastique, les phénomènes d'adsorption prédominent l'absorption. Afin de quantifier le cobalt en concentration massique au sein des échantillons, les étalons développés au Chapitre 3 ont été utilisés pour calibrer le signal analytique. Les résultats sont présentés dans la Figure 4. 9.

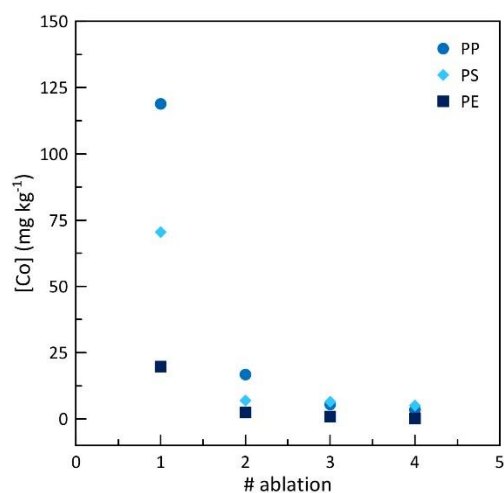


Figure 4. 9 : Concentrations en cobalt, déterminées par LA-ICP-MS en calibrant le signal avec les étalons de plastique développés au Chapitre 3, dans les échantillons de PP (ronds bleus), PS (losanges bleu ciel) et PE (carrés bleu marine) exposés 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction du nombre d'ablations

Les concentrations déterminées par LA-ICP-MS sont inférieures aux concentrations déterminées par ICP-MS (Tableau 4. 3). En prenant le PP pour exemple, alors qu'une concentration moyenne de 41,6 mg kg<sup>-1</sup> est retrouvée dans tout le matériau, les analyses en LA-ICP-MS indiquent une concentration de 118,9 mg kg<sup>-1</sup> pour la première couche ablatée puis seulement 16,7 ; 5,5 et 3,4 mg kg<sup>-1</sup> dans les couches ablatées suivantes. Ainsi, en assimilant les granulés de PP à des sphères puis en calculant le volume ablaté par chaque ablation (qui ablate de 4,3 µm de profondeur) et en considérant qu'après la 4<sup>ème</sup> ablation, aucun cobalt n'est retrouvé dans le matériau, la concentration totale déterminée par LA-ICP-MS serait de 0,98 mg kg<sup>-1</sup>. Soit une valeur près de 42 fois inférieure à la valeur déterminée par ICP-MS. Pour le PE et le PS les valeurs sont, respectivement, 238 et 80 fois inférieures à la valeur déterminée par ICP-MS. Nous devons mentionner ici que les étalons de plastique élaborés sont en matrice PS. Néanmoins, l'écart observé sur les PP et PE ne peut pas être dû à des effets de matrice entre étalon et échantillons analysés puisque même sur les échantillons de PS, la concentration déterminée en LA-ICP-MS est très inférieure à celle déterminée par ICP-MS. Rappelons que les microplastiques ont été exposés 28 jours en mésocosmes, la présence de biofilm en surface des échantillons qui pourrait modifier la réponse analytique par rapport à l'analyse des étalons de plastique ne peut donc pas être écartée. Les effets de la présence de biofilm pourraient également expliquer les fortes fluctuations du signal présentées précédemment (Figure 4. 7) en considérant une couche de biofilm très hétérogène. Il est tout de même à noter que la faisabilité de l'analyse de microplastiques recouverts de biofilm par LA-ICP-MS a déjà été reportée dans la littérature. En comparant la cartographie élémentaire de microplastiques neufs et recouverts de biofilm, Pořízka *et al.*<sup>192</sup> ont en effet montré la possibilité d'observer des changements significatifs dans la distribution des éléments. Nos résultats tendent à montrer que les métaux sorbés sont présents non pas dans le matériau lui-même mais dans la plastisphère qui colonise sa surface. Cette hypothèse sera présentée et discutée dans la section suivante dédiée à l'analyse de surface des échantillons de microplastiques (3.2. Caractérisation de la plastisphère).

Étant donné ces premiers résultats obtenus en LA-ICP-MS qui montrent que le métal se situe principalement dans la première couche ablatée, la suite des résultats présentés dans cette partie se focalise sur le signal obtenu lors d'une seule ablation. Bien que la quantification en LA-ICP-MS ne soit pas applicable *via* nos étalons en raison de la présence très probable de biofilm, nous avons tout de même souhaité étudier de manière qualitative la présence de cobalt dans les échantillons de PP en fonction des durées et des concentrations d'exposition. Pour cela, la répétabilité des analyses avec cette technique d'analyse a été étudiée. Comme pour les analyses de quantification du cobalt total, les signaux obtenus sur les mésocosmes 7 et 11 contenant la plus forte concentration d'exposition (60 µg L<sup>-1</sup>) ont été comparés. Le mésocosme 12 a été mis de côté étant donné les faibles quantités de cobalt

retrouvées dans les microplastiques reportées Tableau 4. 3. Les résultats présentés Figure 4. 10, montrent une légère différence d'intensité du signal suivant le mésocosme étudié.

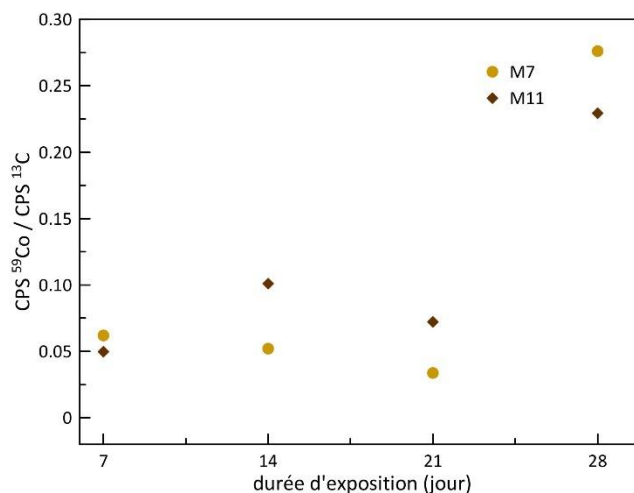


Figure 4. 10 : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés 28 jours dans le mésocosme 7 (ronds jaunes) et 11 (losanges marron) à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction de la durée d'exposition

Le signal du cobalt présent dans le PP du mésocosme 7 est inférieur pour les deux durées d'exposition intermédiaires, tandis que le signal du PP du mésocosme 11 est inférieur pour les durées d'exposition de 7 et 28 jours. Ces différences pourraient être dues à l'adsorption inhomogène du cobalt à la surface des granules de PP. Pour chaque série, le signal à 28 jours est très supérieur aux autres durées d'exposition.

Afin d'estimer l'homogénéité de la surface des microplastiques, un granulé de PP exposé dans le mésocosme 7 a été analysé à trois endroits différents puis la moyenne du signal ainsi que l'écart-type ont été calculés. Cette expérience a été réalisée sur les 4 durées d'exposition (Figure 4. 11).

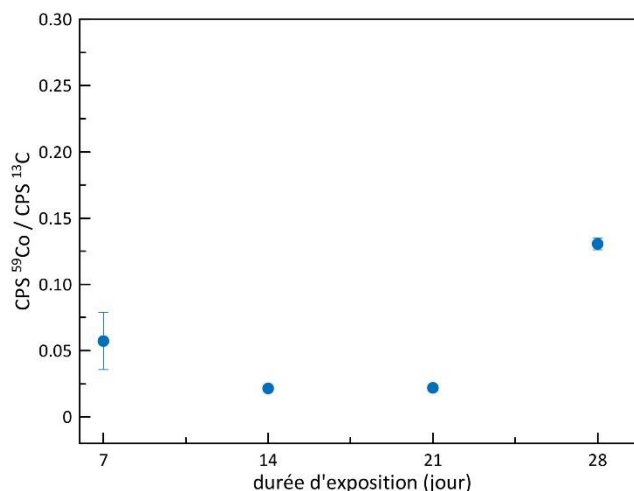


Figure 4. 11 : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés dans le mésocosme 7 à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction de la durée d'exposition. Analyses à trois endroits différents de l'échantillon et calcul des écarts-types

Les résultats montrent des écarts-types assez faibles sauf pour la première durée d'exposition (7 jours). Si, comme reportée dans la littérature, la présence d'une plastisphère joue un rôle déterminant dans l'adsorption des métaux, ce résultat pourrait montrer qu'au bout de 7 jours, le développement du biofilm n'est pas suffisamment avancé pour être présent de façon homogène. La comparaison des résultats des Figure 4. 10 et Figure 4. 11 mettent en évidence les écarts obtenus d'un granulé de PP à l'autre. Ainsi, au bout de 28 jours dans le mésocosme 7, le granulé dont l'analyse est reportée dans la Figure 4. 10 donne un signal de cobalt de 0,28 (en CPS Co/CPS C) tandis qu'un autre granulé, exposé dans les mêmes conditions et au même moment, et dont l'analyse est reportée dans la Figure 4. 11, donne un signal de cobalt de 0,13 (en CPS Co/CPS C). On se rend ainsi compte de la variabilité qui peut être observée dans l'environnement sur des granulés de microplastiques placés dans le même milieu, dans les mêmes conditions et au même instant. Alors que les analyses par ICP-MS sont réalisées sur une quantité importante de granulés (une quinzaine) et permet ainsi d'obtenir une valeur moyenne, les analyses en LA-ICP-MS sont très affectées par la variabilité au sein d'un lot d'échantillon étant donné que l'analyse se fait sur un seul granulé.

Les analyses de LA-ICP-MS présentées jusqu'ici se sont concentrées sur des échantillons exposés à la plus forte concentration en cobalt ( $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Afin de compléter ces résultats, des analyses ont été réalisées sur des échantillons exposés à 6 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobalt. Les résultats sont reportés dans la Figure 4. 12 et les résultats pour une exposition à  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 4. 10, ronds jaunes) y sont également reportés pour faciliter la comparaison. Pour une durée d'exposition de 7 jours à une concentration d'exposition de 6 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , le signal était trop bruité pour être traité.

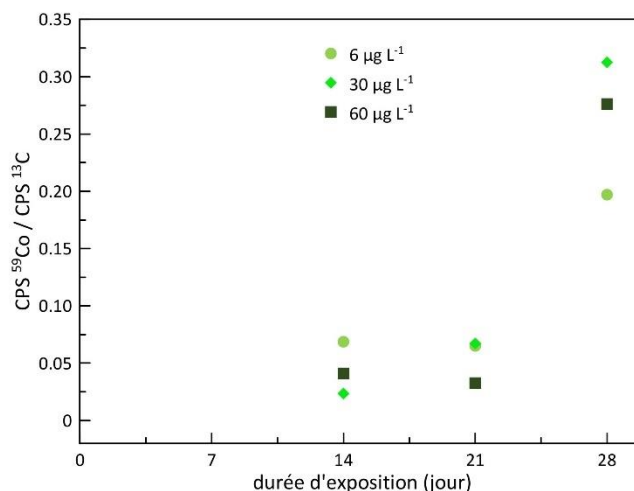


Figure 4. 12 : Analyses en LA-ICP-MS des échantillons de PP exposés en mésocosmes à une concentration en cobalt de 6 (ronds vert clair), 30 (losanges verts) et 60 (carrés vert foncé) µg L<sup>-1</sup> en fonction de la durée d'exposition

À 14 et 21 jours d'exposition, les signaux analytiques des échantillons de PP sont assez proches, quelle que soit la concentration d'exposition : 0,07 ; 0,02 ; 0,04 et 0,06 ; 0,07 ; 0,03 (en CPS <sup>59</sup>Co / CPS <sup>13</sup>C) respectivement et pour les concentrations d'exposition croissantes. À 28 jours, les signaux analytiques croissent fortement et les valeurs sont plus dispersées, avec, pour des concentrations d'exposition croissantes, un signal analytique de 0,20 ; 0,31 et 0,28 (en CPS <sup>59</sup>Co / CPS <sup>13</sup>C). Ces résultats montrent ainsi que la surface suit la même tendance que le matériau entier (Figure 4. 6) puisque les signaux analytiques correspondant au cobalt à l'extrémité de la surface augmentent avec la durée d'exposition sans atteindre de plateaux. En revanche, les tendances ne sont pas les mêmes. Alors que pour les concentrations totales une évolution plutôt linéaire pour des concentrations d'exposition de 6 et 30 µg L<sup>-1</sup> et une évolution plutôt exponentielle pour une exposition à 60 µg L<sup>-1</sup> de cobalt (Figure 4. 6) étaient observées, les analyses de surface (Figure 4. 12) montre des évolution plutôt exponentielle avec la durée d'exposition pour toutes les concentrations d'exposition.

Les analyses visant à déterminer les concentrations en cobalt en profondeur dans les microplastiques ont révélé que le cobalt se trouve principalement à la surface des échantillons. Par ailleurs, la calibration du signal de la LA-ICP-MS avec des étalons de plastique de matrice PS n'a pas fonctionné pour la quantification des concentrations en cobalt à cause de la très probable présence de biofilm à la surface des microplastiques exposés en mésocosmes. Afin de mieux visualiser la surface des échantillons, leurs surfaces ont été imagées par SEM et analysées chimiquement par SEM-EDS. Enfin, des analyses biologiques visant à quantifier l'abondance en microorganismes dans les biofilms ont été réalisées.

### 3.2. Caractérisations de la plastisphère

La plastisphère, soit le biofilm qui colonise la surface d'un plastique, se caractérise par la présence de microorganismes tels que des bactéries et des diatomées observables par SEM. La Figure 4. 13 regroupe les images obtenues sur un microplastique type PP avant et après exposition pendant 28 jours en mésocosmes à une concentration d'exposition en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ . Des images supplémentaires sont disponibles en Annexe 3.

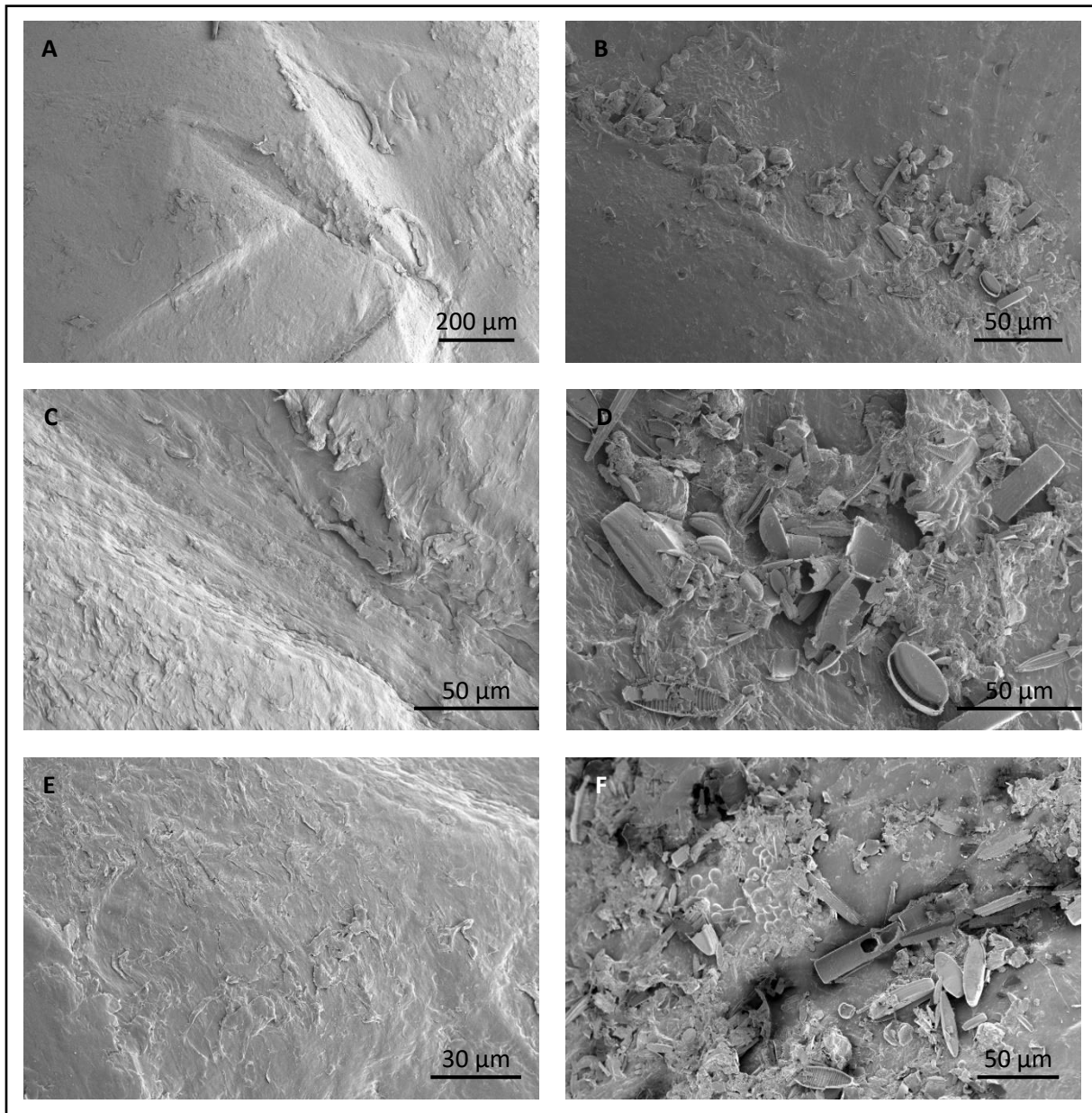


Figure 4. 13 : Images en SEM de (A-C-E) un PP avant exposition et (B-D-F) un PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ . Des images supplémentaires sont disponibles en Annexe 3

Sur le microplastique n'ayant pas été exposé en mésocosmes, aucune communauté microbienne n'est observée à la surface, et celle-ci apparaît relativement lisse. En revanche, pour l'échantillon exposé en

mésocosmes, de nombreux microorganismes sont visibles. Sur la Figure 4. 13B, on peut voir que le biofilm n'est pas présent de façon uniforme à la surface du microplastique. Il est rapporté dans la littérature qu'une surface poreuse facilite l'adhésion des microorganismes par rapport à une surface lisse<sup>175</sup>. Ainsi, les communautés visibles dans la Figure 4. 13B se sont peut-être développées en suivant une rainure dans le microplastique. Les Figure 4. 13D et F, réalisées à plus fort grossissement, permettent de visualiser avec plus de précision la structure des microorganismes présents à la surface du microplastique. Parmi eux, deux communautés se distinguent : les bactéries, qui sont de formes rondes ou allongées et les diatomées, qui ont des formes très structurées et très lisses. Les diatomées, qui sont des microalgues et des organismes dits eucaryotes, semblent présentes en beaucoup plus grand nombre que les bactéries qui sont des organismes dits procaryotes. La présence de cette plastisphère inhomogène (Figure 4. 13B) au sein de laquelle le cobalt serait localisé préférentiellement pourrait expliquer les fluctuations observées dans l'analyse du cobalt lors d'une ablation par LA-ICP-MS. Par ailleurs, la présence de ces microorganismes à eux seuls rend la surface du microplastique accidentée et perturbe la profondeur ablatée.

Afin de quantifier l'abondance en biofilm, une approche de biologie moléculaire de PCR quantitative a été utilisée. La première étape a consisté à extraire l'ADN présent à la surface des échantillons. Cette extraction a été réalisée sur 9 granulés de microplastiques pour chaque échantillon. Étant donné l'hétérogénéité de surface des granulés de microplastiques, il n'a pas été possible de normaliser les données d'ADN extraits avec la surface des microplastiques. Les résultats sont donc exprimés en quantité d'ADN (en ng) présent à la surface de 9 granulés de microplastiques (Figure 4. 14). Les écarts-types ont été calculés sur les 3 valeurs mesurées sur les triplicatas de concentration d'exposition.

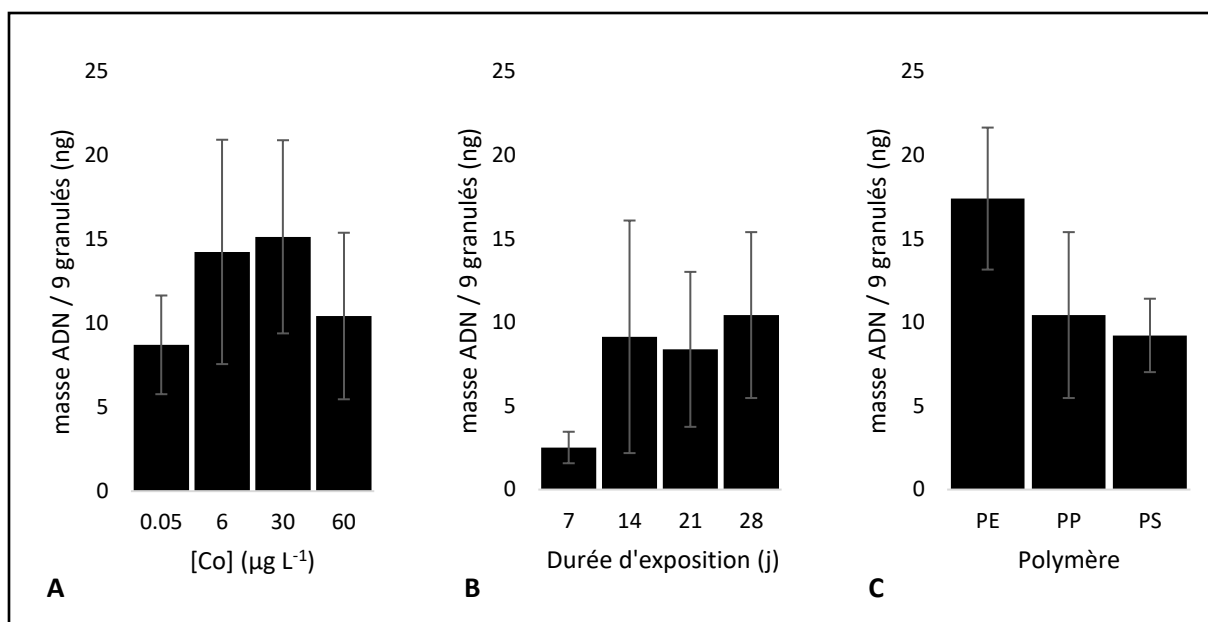


Figure 4. 14 : Quantités d'ADN extrait sur 9 granulés de microplastiques exposés en mésocosmes par qPCR. A) sur du PP exposé 28 jours en fonction de la concentration d'exposition, B) sur du PP exposé à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction de la durée d'exposition et C) sur des microplastiques exposés 28 jours à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction du polymère

La première observation qui peut être faite sur l'ensemble des résultats concerne la disparité des valeurs qui se traduit par des écarts-types très élevés. Les données correspondent à la moyenne des analyses réalisées (i) sur les réplicats de concentrations et (ii) sur 9 granulés de microplastiques. La disparité traduit donc une inhomogénéité de croissance du biofilm au sein des différents mésocosmes contenant des concentrations en cobalt identiques et également au sein des granulés de microplastiques. Une croissance inhomogène du biofilm au sein d'un lot de granulés peut s'expliquer par l'hétérogénéité de surfaces des différents granulés. Ainsi, cette première observation sur les résultats d'extraction d'ADN des échantillons est en accord avec les résultats précédents, notamment les concentrations totales en cobalt dans les échantillons qui différaient selon le mésocosme étudié (à concentration constante) (Tableau 4. 3) et les quantités de cobalt analysées en surface des granulés qui différaient au travers d'un même lot d'échantillons (Figure 4. 10 et Figure 4. 11).

Concernant la quantité d'ADN dans les échantillons de PP exposés 28 jours en fonction de la concentration d'exposition (Figure 4. 14A), cette quantité augmente de  $0,05$  ( $9 \text{ ng}$ ) à  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $15 \text{ ng}$ ) puis diminue à  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $10 \text{ ng}$ ). Ce résultat semble ainsi indiquer qu'une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  inhibe la formation de biofilm. Pour s'en assurer, il serait intéressant de réaliser les mêmes extractions et analyses sur des granulés de microplastiques de PE ou de PS ou bien sur du PP à des durées d'exposition inférieures. Quoi qu'il en soit, ces résultats indiquent que, pour du PP exposé 28 jours, la quantité de biofilm diminue à partir d'une concentration d'exposition en cobalt supérieure à

30  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En comparaison, les concentrations en cobalt totales analysées dans ces mêmes échantillons augmentent avec la concentration d'exposition, même quand celle-ci dépasse 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 4. 6). Ces résultats ont ainsi tendance à indiquer que l'adsorption du cobalt par des microplastiques ne repose pas uniquement sur la présence d'un biofilm à leurs surfaces.

L'évolution de la quantité d'ADN extrait dans des échantillons de PP exposés à une concentration en cobalt de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  en fonction du temps (Figure 4. 14B) indique une forte colonisation de microorganismes entre 7 (2,5 ng) et 14 jours (9 ng) puis la stabilisation de ce phénomène avec 8 et 10 ng d'ADN extrait à, respectivement, 21 et 28 jours. Après avoir atteint un maximum très rapidement, l'abondance en microorganismes à la surface des échantillons semble donc se stabiliser. Cependant, des études indiquent que le biofilm est en constante croissance au cours du temps<sup>193,194</sup>, il est ainsi possible qu'à l'échelle de 14 jours, la colonisation du biofilm semble stable mais que si l'étude avait été portée sur un temps plus long, une évolution croissante de la quantité d'ADN extrait aurait été observée. La comparaison de ces quantités d'ADN extrait avec les analyses de quantification du cobalt total sur ces mêmes échantillons (Figure 4. 6) montre également que les concentrations en cobalt ne sont pas proportionnelles à la quantité d'ADN extrait.

La quantité d'ADN extrait en fonction de la nature des microplastiques, exposés 28 jours à une concentration en cobalt de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 4. 14C), montre des disparités. Alors que 17 ng d'ADN ont été extraits des 9 granulés de PE, 10 ng l'ont été des PP et 9 ng l'ont été des PS. Cette disparité peut d'une part s'expliquer par une différence de surface pour ces 3 échantillons de microplastiques car, comme reporté dans la Figure 4. 4, les échantillons de microplastiques type PE sont plus gros que ceux de type PP et PS. Une autre explication peut provenir de l'affinité des microorganismes aux différents polymères conduisant à la formation d'un biofilm. Des études ont mis en évidence des différences d'abondance dans les communautés microbiennes colonisant des microplastiques qui pourraient être reliées à la présence d'additifs ou à des surfaces plus (rugueuses) ou moins (lisses) propices à l'attachement de microorganismes et à la formation d'un biofilm<sup>195,196</sup>.

Après avoir quantifié l'ADN présent dans les échantillons de microplastiques, les abondances en microorganismes types procaryote et eucaryote ont été déterminées en nombre de copies d'ADN séquencées sur l'ADN extrait de 9 granulés de microplastiques (Figure 4. 15).

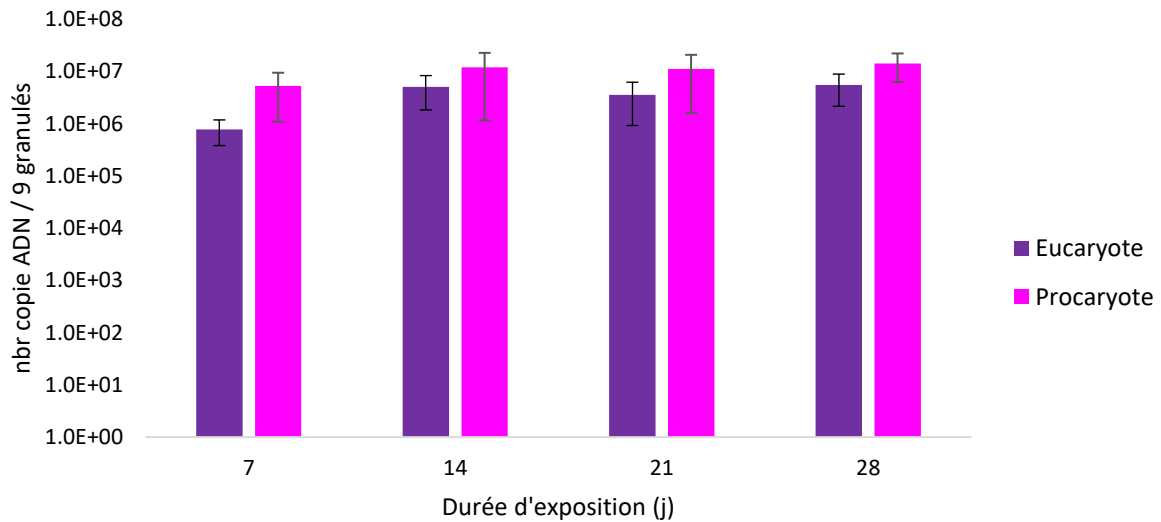


Figure 4. 15 : Nombre de copies d'ADN extraits sur 9 granulés de microplastiques exposés en rivières pilote par qPCR sur des échantillons de type PP exposés à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  en fonction de la durée d'exposition

Ces résultats indiquent d'une part que la quantité de microorganismes augmente entre 7 et 14 jours d'exposition puis se stabilise. Cette observation est en accord avec la Figure 4. 14B dans laquelle la même tendance au niveau de la quantité d'ADN extrait était observée. D'autre part, la quantité d'organismes eucaryotes est inférieure à la quantité d'organismes procaryotes, d'un facteur 2 à 7, quelle que soit la durée d'exposition. Ces résultats viennent ainsi contredire nos observations réalisées par SEM pour lesquelles on semblait observer plus d'organismes eucaryotes que d'organismes procaryotes. Ceci peut cependant s'expliquer par des tailles différentes suivant la taille des organismes : alors qu'un organisme procaryote mesure entre 0,1 et 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, un organisme eucaryote mesure entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. Un organisme eucaryote est ainsi susceptible de cacher des dizaines d'organismes procaryotes. Par ailleurs, nous ne retrouvons pas les mêmes tendances qu'Amaral-Zettler *et al.*<sup>197</sup> qui, dans leur étude, ont montré que les cellules eucaryotes (diatomées) présentes en début de colonisation du biofilm étaient rapidement remplacées par des cellules procaryotes (bactéries) au cours du temps (les diatomées représentaient 65% des microorganismes constituant le biofilm la première semaine puis seulement 19% la deuxième semaine).

Ces résultats d'extraction d'ADN et d'abondance en microorganismes ont ainsi montré la présence d'une quantité importante de microorganismes à la surface des échantillons de microplastiques exposés en mésocosmes, et cela dès 7 jours d'exposition. Ces données ont également permis de mettre en évidence que la quantité de biofilm n'est pas forcément proportionnelle à la concentration en cobalt dans les échantillons. Enfin, les comparaisons de ces résultats en fonction des concentrations d'exposition, des durées d'exposition et des matrices des échantillons sont à tempérer étant donné que ces données ne sont pas normalisées à une surface.

Afin de caractériser chimiquement le biofilm présent à la surface des échantillons et d'identifier la présence du cobalt, le SEM a été couplé à un EDS pour déterminer la composition élémentaire. Deux zones ont été analysées, une zone recouverte de biofilm et une zone plus clairsemée. La zone présentant très peu de biofilm (Figure 4. 16A) est constituée de deux éléments principaux, le carbone avec 91% en masse et l'oxygène avec 7% en masse. Quelques traces de magnésium, aluminium et silicium sont également retrouvées de l'ordre de 2% à eux trois (le platine étant l'élément utilisé pour métalliser l'échantillon). La zone présentant un fort recouvrement en biofilm (Figure 4. 16B) présente quant à elle beaucoup plus d'éléments avec un total de 10 éléments différents (carbone, oxygène, sodium, magnésium, aluminium, silicium, soufre, potassium, calcium et fer). Le pourcentage de carbone diminue, passant à 55%, l'oxygène augmente à 32% et les 3 éléments faiblement présents dans la zone avec peu de biofilm (Mg, Al, Si) passent à un taux de 9%. Les autres éléments (Na, S, K, Ca et Fe) sont présents à un taux de 4%. Des différences de composition élémentaire sont donc clairement identifiées grâce à ces analyses. La présence d'un biofilm à la surface d'un microplastique entraîne ainsi l'apport de nouveaux éléments qui peuvent être responsables de liaisons chimiques spécifiques avec les métaux. Par exemple, dans leur étude, Guan et *al.*<sup>79</sup> ont mis en évidence des mécanismes tels que des interactions électrostatiques, des échanges d'ions cationiques et des phénomènes de complexation entre les métaux et les groupes fonctionnels (carbonyles, amines, phényles) présents à la surface des microplastiques. Ces mécanismes ont été responsables d'une plus forte capacité d'adsorption que des microplastiques sans biofilm pour lesquels seules les interactions électrostatiques dominaient. D'autres études<sup>180,181</sup> font état d'une augmentation de l'hydrophobicité et de l'apparition de sites de liaisons supplémentaires dues à la colonisation de la surface du microplastique par un biofilm. Par exemple<sup>178</sup>, l'existence de groupes fonctionnels anioniques tels que des groupes carboxyles ou des groupes phosphates des parois cellulaires améliore l'adsorption des métaux. Finalement, de nombreuses études s'accordent sur l'existence de processus d'adsorption différents suivant la présence ou non de biofilm à la surface des microplastiques<sup>79,178,182</sup>. Alors que sur des microplastiques sans biofilm, les mécanismes d'adsorption sont régis par des phénomènes de diffusion intraparticulaire, en présence de biofilm ce sont des phénomènes de diffusion du film qui ont lieu.

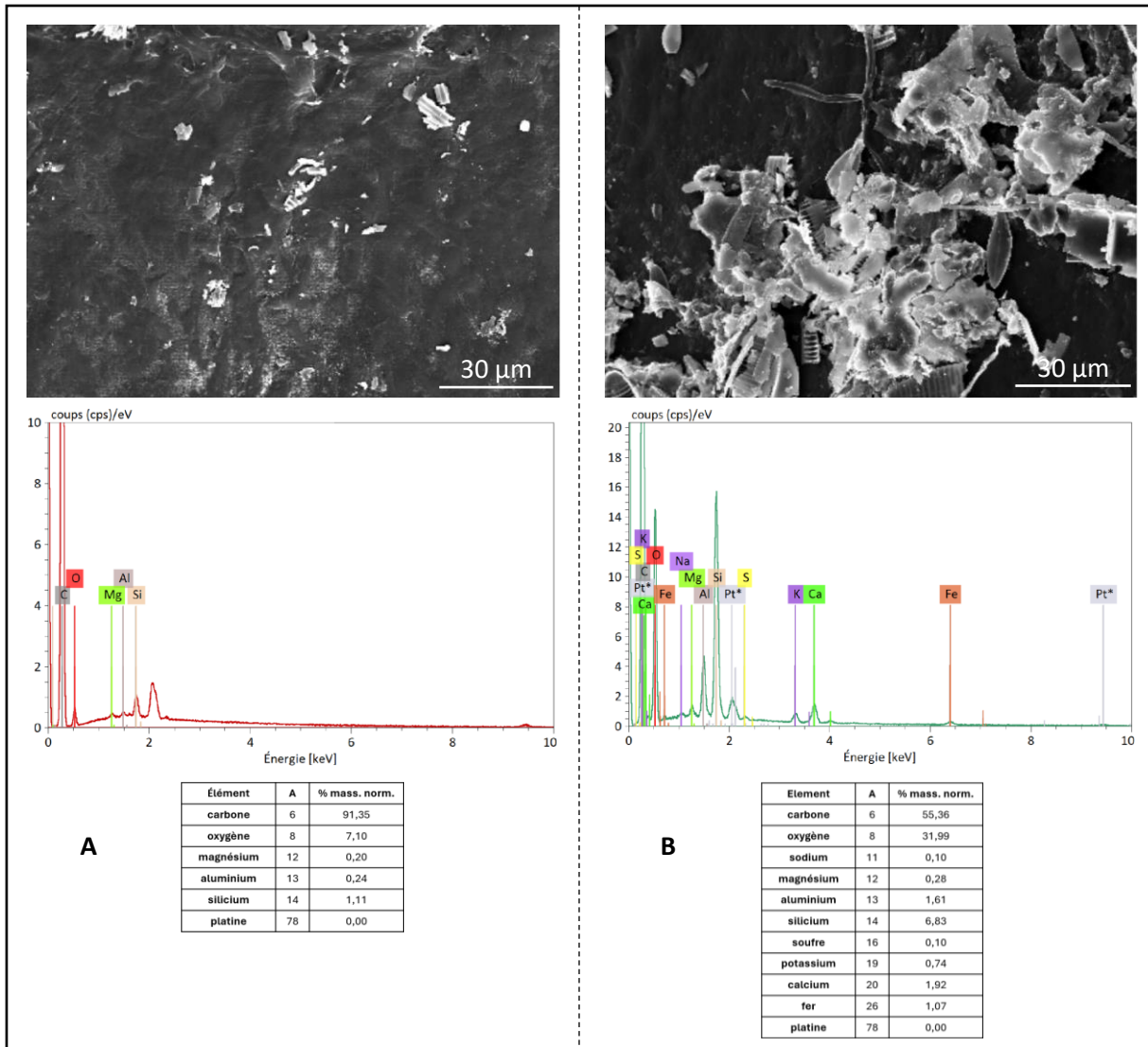


Figure 4. 16 : Analyses SEM-EDS d'un échantillon de PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  A) d'une zone avec peu de biofilm et B) d'une zone riche en biofilm. Images des zones analysées, spectres de rayon X et identification des éléments et tableaux des résultats de la quantification des éléments identifiés

Ces analyses de SEM-EDS ont donc permis de caractériser les différences de composition élémentaire à la surface d'un microplastique avec et sans biofilm mais n'ont pas permis de détecter la présence de cobalt. En effet, sur toutes les analyses réalisées à différents endroits des échantillons, aucun signal correspondant au cobalt n'a été détecté, il est possible que cela soit dû à sa trop faible quantité, cependant la LOD de l'instrument pour cet élément n'est pas connue. Il est à noter que plusieurs équipes ont comparé les capacités d'adsorption de différents métaux sur des microplastiques colonisés par un biofilm et ont montré que la capacité d'adsorption du cobalt était l'une des plus faibles. Par exemple, Guan *et al.*<sup>79</sup> ont rapporté que parmi le cobalt, le nickel, le cuivre, le zinc, le cadmium et l'argent, le PS expansé présente des capacités d'adsorption les plus faibles pour le cobalt et l'argent. Wu *et al.*<sup>183</sup> ont comparé l'adsorption du cobalt, du nickel, du cuivre, du zinc, du cadmium et du chrome

sur du PS et ont montré que c'est pour le cadmium et le cobalt que le PS non expansé présente les capacités d'adsorption les plus faibles. Quant à l'étude de Richard *et al.*<sup>179</sup>, ils se sont intéressés à l'adsorption d'une vingtaine de métaux sur des échantillons de microplastiques (PLA et HDPE) immergés 28 jours et ont réalisé des tests du rapport de vraisemblance ('likelihood ratio test') en prenant trois variables prédictives : l'accumulation de biofilm, l'emplacement de l'expérience et la composition chimique du microplastique. Alors que l'adsorption de certains éléments étaient affectée par seulement une ou deux de ces variables prédictives, l'adsorption du cobalt (avec le manganèse et le magnésium) s'est révélée être dépendante des 3 variables.

Si les analyses en SEM-EDS n'ont pas permis d'identifier la présence du cobalt dans les biofilms, les résultats en ICP-MS confirment l'adsorption de cobalt et les analyses en LA-ICP-MS informent que le cobalt se situe en surface des échantillons de microplastiques. Afin de pouvoir affirmer que le biofilm joue un rôle important dans l'adsorption du cobalt par les microplastiques, une dernière expérience en laboratoire a été réalisée. Celle-ci a consisté à réaliser l'expérience des mésocosmes dans des conditions les plus proches possibles mais en évitant la prolifération d'une plastisphère. Ainsi, si aucun cobalt n'est retrouvé dans les échantillons de cette dernière expérience, alors cela signifierait que l'adsorption du métal est bien corrélée à la présence de biofilm.

### 3.3. Impact de la présence de biofilm sur l'adsorption du cobalt

Pour cette partie, une eau de rivière synthétique contenant les minéraux présents naturellement a été préparée et un biocide a été ajouté, l'azoture de sodium, afin de limiter le développement bactérien. Les milieux d'études ont également été stérilisés tout comme les contenants et les échantillons de microplastiques. Les solutions d'eau de rivière synthétique ont été adjuvées de cobalt à trois concentrations cibles différentes : 0 – 6 – 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ . À la différence des expériences en mésocosmes, le milieu d'étude n'était pas un flux continu et le milieu n'a pas été renouvelé durant toute la durée de l'expérience. Les concentrations en cobalt ont été analysées afin de s'assurer que les concentrations restaient constantes tout au long de l'expérience (Annexe 2). Ces concentrations se sont avérées plus faibles qu'attendues mais sont restées stables au cours de l'expérience et donc aucune adjonction de sel de cobalt n'a été nécessaire au cours de l'étude.

Pour vérifier l'absence de développement de biofilm à la surface des échantillons, des analyses en SEM ont été menées sur les échantillons exposés 28 jours dans les eaux de rivière synthétique à une concentration en cobalt de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 4. 17). Sur les nombreuses zones analysées en SEM, aucune présence de microorganismes types diatomées (eucaryotes) n'a été identifiée. Malgré nos précautions,

des bactéries (procaryotes) ont été identifiées notamment dans les rainures du microplastique. L'impact de la présence de microalgues sur l'adsorption du cobalt peut donc être étudié.

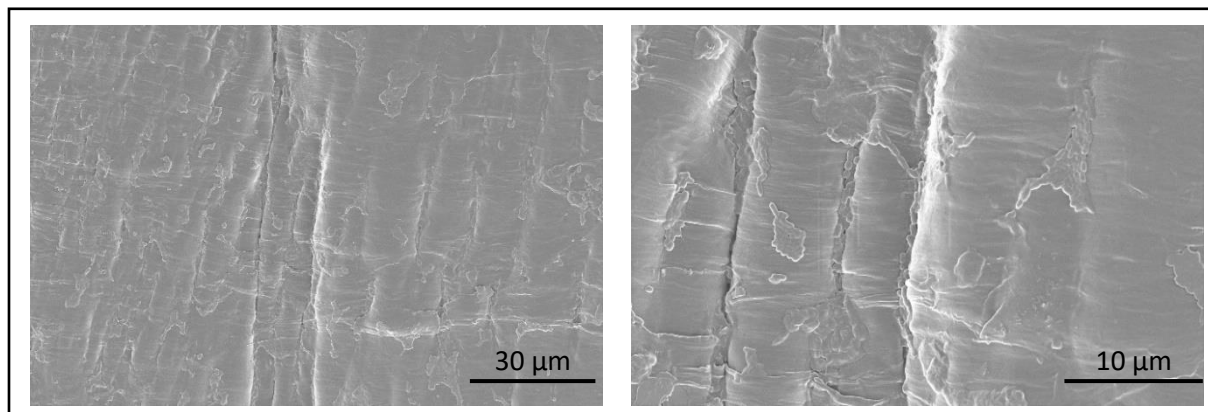


Figure 4. 17 : Images en SEM d'un PP exposé 28 jours en eau de rivière synthétique à une concentration en cobalt de 60 µg L<sup>-1</sup>

La quantification du cobalt total présent dans les échantillons après 28 jours d'exposition en eau de rivière synthétique adjuvée de 60 µg L<sup>-1</sup> de cobalt a été réalisée par ICP-MS et les résultats sont reportés dans le Tableau 4. 5. Comme pour l'analyse des concentrations en cobalt dans les échantillons de microplastiques avant exposition (Tableau 4. 2), les valeurs de LOD et de LOQ correspondant à la calibration du signal du cobalt sont données en CPS et en concentration en cobalt après application de l'équation obtenue lors de la calibration du signal. Les LOD et LOQ sont données avec ces deux unités afin de rendre compte de la faiblesse du signal obtenu sur les échantillons. Ainsi, le signal sur les microplastiques exposés en eau de rivière synthétique est près de 3 fois à plus de 16 fois inférieur au signal analytique correspondant à la LOD. Les échantillons de microplastiques sont donc exempts de cobalt malgré une exposition à 60 µg L<sup>-1</sup> pendant 28 jours. Pour comparaison, les microplastiques de HDPE, PP et PS exposés en mésocosmes pendant 28 jours et à la même concentration en cobalt contiennent des teneurs en cobalt, exprimées en CPS, de 326 500, 453 300 et 487 500 respectivement.

Tableau 4. 5 : LOD et LOQ du signal analytique en ICP-MS du cobalt et analyses des échantillons de microplastiques exposés 28 jours en eau de rivière synthétique à une concentration en cobalt de 60 µg L<sup>-1</sup>

|            | CPS     | [Co] (mg kg <sup>-1</sup> ) |             | CPS    |
|------------|---------|-----------------------------|-------------|--------|
| <b>LOD</b> | 124 000 | 0,2                         | <b>HDPE</b> | 7 600  |
| <b>LOQ</b> | 412 000 | 0,8                         | <b>PP</b>   | 38 800 |
|            |         |                             | <b>PS</b>   | 14 800 |

Les analyses en LA-ICP-MS montrent également l'absence de cobalt dans les échantillons. La Figure 4. 18 reporte le signal brut du cobalt normalisé par le signal du carbone pour un échantillon de PP exposé

en mésocosmes (violet) et en eau de rivière synthétique (gris) en absence de microalgues. Le signal correspondant à l'échantillon exposé en eau de rivière synthétique est beaucoup plus faible que pour le même échantillon exposé en mésocosmes. Les analyses en LA-ICP-MS confirment les résultats obtenus par ICP-MS, à savoir qu'il n'y a pas d'adsorption de cobalt sur les microplastiques exposés en eau de rivière synthétique en absence de microalgues.

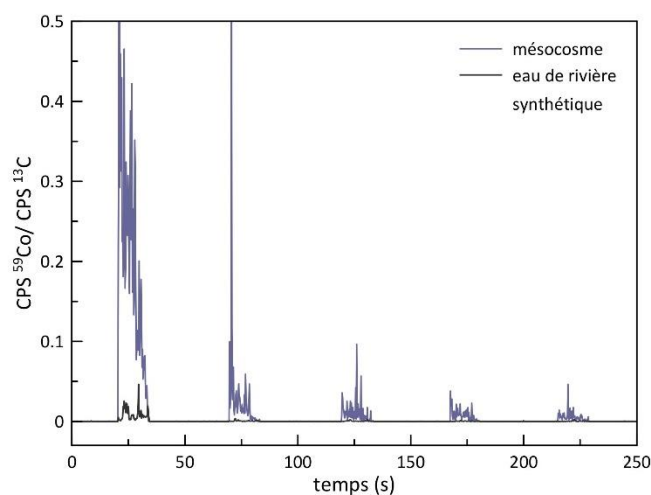


Figure 4. 18 : Analyses en LA-ICP-MS d'un échantillon de PP exposé 28 jours en mésocosmes (violet) et en eau de rivière synthétique (gris) à une concentration en cobalt de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$

Nos résultats montrent ainsi que l'adsorption de métaux dans des microplastiques est corrélée à la présence de biofilm à la surface du matériau. De nombreuses études font état du même résultat<sup>79,175,177-184</sup>. Cependant, les études ayant comparé l'adsorption de métaux en présence et en absence de biofilm, ont montré que des métaux sont bien retrouvés dans les microplastiques sans biofilm, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Par exemple, Guan *et al.*<sup>79</sup> reportent une quantité maximale d'adsorption du cobalt pour un microplastique sans biofilm environ deux fois inférieure à celle d'un microplastique recouvert d'un biofilm (197,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  et 377  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivement). Toutefois, leur étude sur les isothermes d'adsorption est réalisée avec des concentrations allant de 10 à 1 000  $\mu\text{g L}^{-1}$  quand notre concentration maximale s'élève à 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Leurs résultats permettent ainsi de connaître le comportement des microplastiques dans un environnement très pollué tandis que nos résultats permettent d'appréhender leurs comportements dans des conditions qui pourraient être plus probablement rencontrées en milieu naturel.

Finalement, notre étude ayant été réalisée sur des granulés de microplastiques de taille proche des 5 mm, elle est restreinte aux microplastiques de plus grande taille<sup>8</sup>. Pour compléter ces résultats, il est possible de s'appuyer sur l'étude de Wu *et al.*<sup>183</sup> dans laquelle la colonisation du biofilm et l'adsorption des métaux ont été étudiées sur des microplastiques de PS d'une taille de 4 mm (granulé) et de 75  $\mu\text{m}$

(poudre). Ils ont alors montré que les capacités d'adsorption des plus petits microplastiques étaient 1,3 à 4,1 fois supérieures aux capacités d'adsorption des plus gros microplastiques. Il semble donc que plus les particules de plastique sont petites, plus l'adsorption de métal est importante. Ceci s'explique par une meilleure colonisation du biofilm grâce à une surface plus importante.

#### 4. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle du biofilm dans l'adsorption des métaux (ici le cobalt) à la surface de microplastiques et de mieux comprendre l'impact des débris plastiques en tant que vecteurs de métaux dans les environnements aquatiques. Notre protocole expérimental réalisé en mésocosmes a été mené à différentes concentrations en cobalt et dans des conditions autorisant la formation de biofilm à la surface des microplastiques, des critères qui permettent de se rapprocher des conditions environnementales et des phénomènes qui s'y déroulent. À notre connaissance, réaliser une telle étude dans ces conditions expérimentales est une nouveauté et devrait ainsi pouvoir apporter à la communauté scientifique des données strictement transposables à ce qui se produit dans l'environnement.

Le couplage de plusieurs techniques analytiques nous a permis d'obtenir des résultats précis concernant la sorption de métal par des microplastiques en conditions environnementales. Les analyses des concentrations totales en cobalt dans nos échantillons par ICP-MS ont confirmé l'adsorption de cobalt par le HDPE, PP et PS exposés 28 jours à  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobalt avec des concentrations analysées comprises entre 30 et  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ . L'analyse spécifique des échantillons de PP a montré une adsorption du cobalt dès 7 jours d'exposition à une concentration d'exposition de  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  avec une concentration analysée de  $2,9 \text{ mg kg}^{-1}$ . Les analyses de LA-ICP-MS quant à elles, ont permis de mettre en évidence que l'adsorption du cobalt, dans nos conditions expérimentales, a lieu sur la surface des échantillons et que cette adsorption suit une évolution exponentielle en fonction de la durée d'exposition, et ce, pour toutes les concentrations d'exposition. Les analyses en SEM ainsi que les analyses d'abondance en microorganismes ont montré la présence d'une importante communauté bactérienne à la surface des échantillons exposés en mésocosmes. Finalement, notre dernière expérience réalisée en eau de rivière synthétique et dans des conditions permettant l'absence de colonisation des échantillons par des microalgues a montré l'absence de sorption de cobalt par les échantillons. Cette dernière expérience montre ainsi le rôle important que joue le biofilm, notamment quand il est constitué d'organismes eucaryotes comme des microalgues, dans la capacité d'adsorption des métaux par des microplastiques.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier les phénomènes de désorption du cobalt des échantillons. En effet, il semblerait que la présence d'un biofilm à la surface des microplastiques permette également d'y retenir les métaux. C'est ce que l'étude de Rozman *et al.*<sup>180</sup> a montré avec le plomb sur des échantillons de PE. Deux jours après leur expérience d'isothermes d'adsorption, 21% du plomb adsorbé sur les microplastiques sans biofilm s'étaient désorbés tandis que les concentrations en plomb dans les échantillons de microplastiques avec biofilm sont restées stables. Pour finir, l'étude de Guan *et al.*<sup>79</sup> a comparé les capacités d'adsorption de métaux, dont le cobalt, sur différents adsorbants :

sur la plastisphère mais également sur des particules en suspension et sur des sédiments superficiels en eau douce. Ils ont, certes, montré que ces deux adsorbants ont des capacités d'adsorption supérieures à celle de la plastisphère mais surtout que la diffusion de plastique dans l'environnement apporte un support de plus pour la bioaccumulation et le transport des métaux.

Finalement, ce chapitre apporte un regard nouveau sur les phénomènes d'adsorption des métaux sur des microplastiques en conditions environnementales et pointe le rôle crucial que joue le biofilm. Sur la base de nos résultats, il est important aujourd'hui et pour plus de rigueur que par le passé, de veiller à ce que (i) pour les études visant à déterminer uniquement les capacités d'adsorption des métaux par les micro- nanoplastiques, la présence de microorganismes dans les échantillons soit contrôlée afin d'éviter la présence de biofilm, (ii) les études visant à déterminer les capacités d'adsorption des micro-nanoplastiques dans un objectif de comprendre les phénomènes qui se déroulent dans l'environnement soient faites, en revanche, en présence de biofilm à la surface des échantillons.

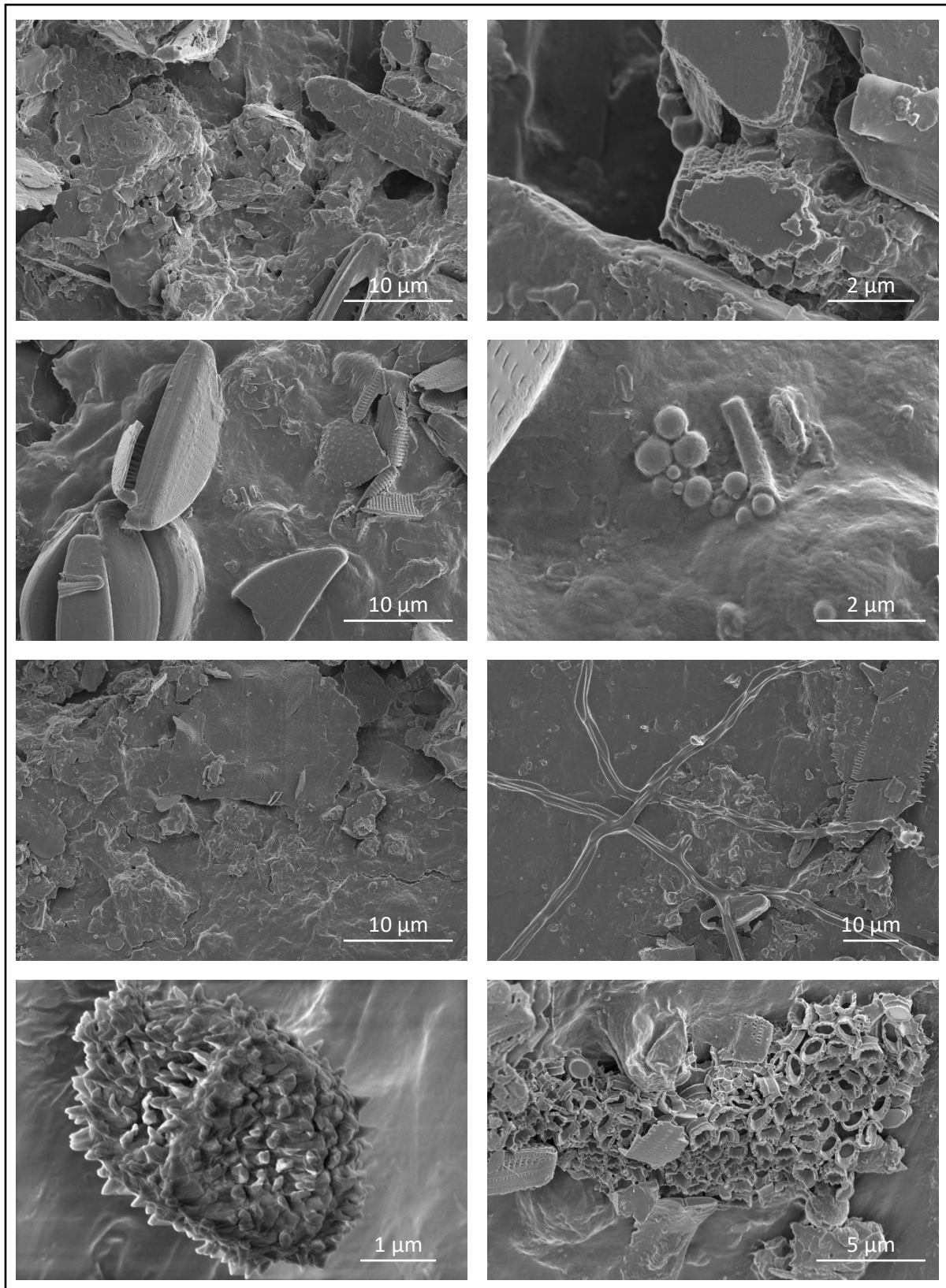
Annexes

| temps (j) | [Co] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |
|-----------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
|           | M6                            | M8  | M14 | M5  | M10 | M15 | M2   | M3   | M9   | M7   | M11  | M12  |
| 1         | 0,2                           | 0,5 | 0,1 | 5,3 | 5,7 | 5,7 | 26,1 | 28,3 | 29,8 | 66,5 | 59,9 | 63,9 |
| 3         | 0,9                           | 0,2 | 0,1 | 5,3 | 5,9 | 5,8 | 24,3 | 25,8 | 29,6 | 58,8 | 61,0 | 60,1 |
| 7         | 0,3                           | 0,8 | 0,7 | 5,7 | 5,5 | 5,5 | 35,3 | 36,7 | 32,7 | 70,3 | 70,0 | 69,3 |
| 14        | 0,1                           | 0,2 | 0,2 | 5,4 | 4,9 | 6,1 | 30,7 | 35,1 | 34,4 | 61,8 | 65,7 | 62,0 |
| 21        | 0,4                           | 0,1 | 0,1 | 4,8 | 5,0 | 5,3 | 37,3 | 39,1 | 39,6 | 68,1 | 71,5 | 67,7 |
| 28        | 0,1                           | 0,1 | 0,3 | 5,1 | 4,8 | 5,3 | 23,9 | 27,9 | 31,4 | 63,5 | 68,2 | 64,4 |

Annexe 1 : Concentrations en cobalt déterminées par ICP-MS dans les mésocosmes (M) en fonction du temps

| temps (j) | [Co] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |                        |                         |
|-----------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|
|           | 0 $\mu\text{g L}^{-1}$        | 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 0         | 0,0                           | 4,3                    | 42,4                    |
| 7         | 0,0                           | 3,8                    | 36,8                    |
| 14        | 0,0                           | 3,5                    | 36,1                    |
| 21        | 0,0                           | 3,3                    | 34,3                    |
| 28        | 0,0                           | 3,2                    | 35,6                    |

Annexe 2 : Concentrations en cobalt déterminées par ICP-MS dans les eaux de rivières synthétiques en fonction du temps



Annexe 3 : Images en SEM d'un PP exposé 28 jours en mésocosmes à une concentration en cobalt de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$



## **Conclusions générales et perspectives**

Face à la nécessité de caractériser le comportement des micro- nanoplastiques disséminés dans tous les écosystèmes, les chercheurs se sont tournés vers la synthèse de modèles pour la réalisation de leurs études. Dans ces travaux, nous avons développé des modèles de nanoplastiques que nous avons ensuite marqués en suivant plusieurs stratégies. Notre choix s'est tourné vers le marquage métallique qui présente des avantages intéressants notamment en termes de méthodes analytiques (ICP-MS en mode normale et en mode comptage de particules) et de la possibilité de quantifier à des concentrations environnementales ( $\text{ng L}^{-1}$ ) et dans des matrices complexes.

- La première stratégie débute par la synthèse de particules par copolymérisation en émulsion sans tensio-actif de styrène et d'acide acrylique en présence d'un agent de réticulation. En dispersion aqueuse, les caractéristiques de ces modèles sont semblables à celles des nanoplastiques non réticulés, avec notamment des diamètres moyens d'environ 350 nm. Les particules réticulées obtenues gonflent en solvant organique et cette propriété a été mise à profit pour permettre la diffusion de métal au cœur des particules. Ces dernières peuvent être considérées comme des modèles de nanoplastiques qui ne contiennent pas de tensio-actifs et qui ont des formes sphériques ainsi qu'une surface oxydée par des fonctions carboxyliques. Le nanoplastique réticulé a ensuite été marqué avec du cuivre sous forme ionique solubilisé dans du DMF grâce à ses propriétés de gonflement – diffusion. L'optimisation du protocole a permis la synthèse de nanoplastiques modèles marqués avec 58 ag de cuivre par nanoplastique. Par rapport à la densité intrinsèque du PS qui est de 1,04 ; cette caractéristique n'augmente que de 2%. Le marquage par diffusion de métaux ioniques au cœur de nanoplastiques réticulés est donc intéressant puisqu'il n'engendre pas une augmentation significative de la densité du modèle significative. Cette stratégie est efficace car elle conduit à des modèles de nanoplastiques marqués métalliquement. Un marquage à une concentration supérieure pourrait être étudié afin de dépasser plus largement la LOD de la méthode analytique utilisée (SP-ICP-MS). Les phénomènes de désorption ont été quantifiés à temps long (34 jours) et montrent une désorption de 65% des traceurs. Ce résultat ne remet pourtant pas en cause l'intérêt de ces modèles dont la caractérisation devra se poursuivre avec des suivis cinétiques de désorption afin de borner leurs conditions d'utilisation pour des études (éco)-toxicologiques.

- La deuxième stratégie utilise le procédé de nanoprécipitation. Cette méthode permet d'obtenir des nanoplastiques sphériques à partir de polymères solubilisés en solvant organique. Ce protocole a permis d'obtenir des modèles de nanoplastiques à partir d'homopolymères de PS ainsi que de copolymères de PS-PAA et de PS-PVBA. Les avantages de ce protocole sont qu'il est possible de modifier de nombreux paramètres (concentration en PS, ratio solvant / non-solvant, vitesse d'introduction en

non-solvant, ...) pour moduler les dimensions finales du modèle, que cette méthode ne nécessite pas l'ajout de tensio-actifs ou encore, qu'elle est rapide et facile à mettre en œuvre. Cette méthode pourrait donc être exploitée dans d'autres travaux visant à développer de nouveaux modèles de nanoplastiques. La stratégie prévoit l'encapsulation de nanoparticules d'or lors de la nanoprécipitation. Nous avons synthétisé plusieurs lots de nanoparticules d'or en phase aqueuse et en phase organique (THF) dont les diamètres sont en accord avec la méthode analytique employée (SP-ICP-MS) et avec l'objectif final, à savoir, l'obtention de nanoplastiques modèles dont la densité n'est pas significativement impactée par la présence du marqueur métallique. Cette stratégie par nanoprécipitation a permis, *in fine*, d'élaborer des nanoplastiques de diamètres compris entre 15 et 350 nm marqués avec des nanoparticules d'or de diamètres compris entre 10 et 50 nm. Des analyses complémentaires peuvent être envisagées pour déterminer si les nanoparticules d'or sont au cœur ou à la surface des nanoplastiques ainsi que pour séparer les modèles de nanoplastiques de densité élevée.

- L'autre axe de ces travaux de recherche s'est articulé autour de la problématique de la quantification des métaux pouvant engendrer une toxicité propre dans les micro-nanoplastiques. Parmi les méthodes analytiques permettant l'analyse de métaux dans des plastiques, notre choix s'est arrêté sur la LA-ICP-MS. Cette technique permet l'analyse en surface et la distinction entre métaux présents en tant qu'additifs (profils de concentration en profondeur constants) des métaux présents après sorption dans l'environnement (profils de concentration en profondeur décroissants). Cependant, si cette technique permet l'identification des métaux et la distinction de leurs origines, leurs quantifications nécessitent le développement d'étalons de plastique chargés en métaux pour la calibration du signal. Nous avons donc développé un protocole pour leurs élaborations qui s'appuie sur la sorption de métaux à la surface de particules de polystyrène carboxylé, considérées comme des nanoplastiques modèles. La synthèse en émulsion sans tensio-actif de ces nanoplastiques a été suivie de leurs expositions à des concentrations en métaux sous forme ionique. Les isothermes d'adsorption ont été modélisés selon la théorie des isothermes de Freundlich qui décrit une adsorption multicouche et les constantes d'adsorption ont été déterminées pour les 4 métaux cibles de notre étude ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ). Les nanoplastiques sorbés de métaux ont ensuite été moulés en microplastiques sous la forme de pastilles qui contiennent les métaux à des concentrations allant de 0 à quelques centaines de  $mg\ kg^{-1}$  et même jusqu'à plusieurs milliers de  $mg\ kg^{-1}$  pour le  $Pb^{2+}$ . La calibration du signal de LA-ICP-MS a conduit à des coefficients de détermination compris entre 0,96 et 0,999. Nos pastilles peuvent être considérées comme des étalons plastiques qui permettent de quantifier les métaux de débris plastiques échantillonnés dans l'environnement. Ce protocole peut maintenant être repris pour combler les lacunes des étalons commerciaux non seulement en étendant la gamme de métaux mais aussi en proposant des étalons comprenant des concentrations en métaux très larges.

- Après avoir développé des étalons plastiques permettant la calibration du signal de LA-ICP-MS et donc la quantification des métaux dans des échantillons de microplastiques, nous avons mené une expérience *in-situ* visant à étudier l'adsorption de cobalt sur des microplastiques. Cette étude a été réalisée dans des mésocosmes de type rivières pilotes mimant fidèlement les conditions environnementales. Les résultats de cette étude ont permis de caractériser l'adsorption du cobalt dans des microplastiques de différents types (PE, PP et PS) et notamment de pointer le rôle que joue le biofilm dans ce phénomène. Les phénomènes de sorption du cobalt ont été caractérisés grâce au couplage de plusieurs techniques analytiques : ICP-MS pour les teneurs totales et LA-ICP-MS et SEM-EDS pour les analyses en surface. Les résultats montrent l'adsorption de cobalt à hauteur de 30 et 40 mg kg<sup>-1</sup> par les microplastiques de HDPE, PP et PS exposés 28 jours à 60 µg L<sup>-1</sup> de sel de cobalt. Les analyses de surface et d'abondance en microorganismes révèlent la présence d'une importante communauté microbienne composée d'organismes eucaryotes et procaryotes à la surface des échantillons exposés en mésocosmes. Nos résultats ont corrélé les phénomènes d'adsorption à la formation du biofilm.

À partir de ces résultats, plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

(1) Concernant les nanoplastiques modèles marqués métalliquement développés par diffusion de cuivre ionique au sein des particules, il est nécessaire d'étudier les cinétiques de désorption du marqueur. Si la désorption du traceur est raisonnable ou inexistante en début d'exposition, alors ces modèles pourraient être utilisés en études (éco)-toxicologiques courtes. Il est également nécessaire d'augmenter la quantité de cuivre introduite dans les modèles afin de dépasser les LOD de la méthode analytique et ainsi détecter tous les nanoplastiques modèles marqués. Concernant les modèles marqués par encapsulation de nanoparticules d'or, il est nécessaire de déterminer la position relative du traceur par rapport aux nanoplastiques. Si le traceur est en surface du nanoplastique, alors celui-ci pourra interférer avec le milieu d'étude et provoquer un biais dans les études d'(éco)-toxicologie. Pour ces modèles, il est également nécessaire de mettre au point un protocole de séparation des modèles en fonction de leurs densités afin de respecter une densité du modèle proche du nanoplastique d'origine. Cette étape de séparation pourra également conduire à l'obtention de dispersions monodisperses de modèles si cela est nécessaire pour les études envisagées.

(2) Concernant le développement d'étalons plastiques pour la calibration du signal de LA-ICP-MS, plusieurs perspectives sont envisagées. La première est d'élaborer plus d'étalons de Co<sup>2+</sup> et de Mn<sup>2+</sup> avec des concentrations intermédiaires afin d'obtenir des courbes de calibration reposant sur une gamme de concentrations plus large. Il est aussi envisagé de synthétiser des étalons plastiques

contenant des concentrations en métaux plus importantes afin de pouvoir quantifier des concentrations en métaux supérieures dans des microplastiques environnementaux. Par exemple, l'étalon plastique le plus chargé en  $Pb^{2+}$  a une concentration de  $4\,400\text{ mg kg}^{-1}$  mais la littérature reporte des concentrations environnementales en ce métal pouvant aller jusqu'à  $30\,000\text{ mg kg}^{-1}$ . Pour augmenter les concentrations en métaux dans les étalons, la possibilité de sorber un seul métal par dispersion de particules de polystyrène carboxylé pourrait être étudiée. Enfin, la dernière perspective concernant ces étalons serait d'étudier les possibilités de sorber d'autres métaux et de réaliser ces étalons avec des matrices autres que du PS dans une optique de répondre aux besoins spécifiques de ce domaine de recherche.

(3) Concernant l'étude de l'adsorption de cobalt par des microplastiques en mésocosmes, il serait intéressant de poursuivre ces recherches sur des temps plus longs afin de déterminer les durées nécessaires pour atteindre la saturation des microplastiques. D'ailleurs, des concentrations en métal sorbé supérieures pourraient permettre de dépasser les LOD de l'EDS et ainsi pouvoir identifier la présence du cobalt à la surface des échantillons. Cette étude pourrait également être réalisée sur d'autres métaux. La présence de plusieurs métaux en même temps dans le milieu pourrait aussi permettre de caractériser une éventuelle compétition ou au contraire une synergie dans l'adsorption des métaux par les microplastiques. Enfin, pour pouvoir calibrer le signal analytique de LA-ICP-MS en vue d'analyser des échantillons de microplastiques recouverts de biofilm, il serait intéressant d'étudier la faisabilité du développement d'étalons constitués non pas d'une matrice polymère mais d'une matrice de type biofilm.





---

## Références

- 1 D. Hosler, S. L. Burkett and M. J. Tarkanian, Prehistoric Polymers: Rubber Processing in Ancient Mesoamerica, *Science*, 1999, **284**, 1988–1991.
- 2 T. Hancock, *Personal Narrative of the Origin and Progress of the Caoutchouc or India-Rubber Manufacture in England*, Longman, Brown, Green, Longmans, & Roberts, London, 1857.
- 3 R. Geyer, J. R. Jambeck and K. L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Sci. Adv.*, 2017, **3**, e1700782.
- 4 Plastic Europe, *Plastics - the Facts 2022*, 2022.
- 5 Plastic Europe, *Plastics - the Facts 2018*, 2018.
- 6 I. S. Lase, D. Tonini, D. Caro, P. F. Albizzati, J. Cristóbal, M. Roosen, M. Kusenberg, K. Ragaert, K. M. Van Geem, J. Dewulf and S. De Meester, How much can chemical recycling contribute to plastic waste recycling in Europe? An assessment using material flow analysis modeling, *Resour. Conserv. Recycl.*, 2023, **192**, 106916.
- 7 L. Lebreton, B. Slat, F. Ferrari, B. Sainte-Rose, J. Aitken, R. Marthouse, S. Hajbane, S. Cunsolo, A. Schwarz, A. Levivier, K. Noble, P. Debeljak, H. Maral, R. Schoeneich-Argent, R. Brambini and J. Reisser, Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 4666.
- 8 J. P. G. L. Frias and R. Nash, Microplastics: Finding a consensus on the definition, *Mar. Pollut. Bull.*, 2019, **138**, 145–147.
- 9 A. Cozar, F. Echevarria, J. I. Gonzalez-Gordillo, X. Irigoien, B. Ubeda, S. Hernandez-Leon, A. T. Palma, S. Navarro, J. Garcia-de-Lomas, A. Ruiz, M. L. Fernandez-de-Puelles and C. M. Duarte, Plastic debris in the open ocean, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, **111**, 10239–10244.
- 10 J. Gigault, A. ter Halle, M. Baudrimont, P.-Y. Pascal, F. Gauffre, T.-L. Phi, H. El Hadri, B. Grassl and S. Reynaud, Current opinion: What is a nanoplastic?, *Environ. Pollut.*, 2018, **235**, 1030–1034.
- 11 J. Gigault, B. Pedrono, B. Maxit and A. Ter Halle, Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction, *Environ. Sci. Nano*, 2016, **3**, 346–350.
- 12 K. N. Fotopoulou and H. K. Karapanagioti, *Degradation of Various Plastics in the Environment*, Springer International Publishing, Cham, 2017, vol. 78.
- 13 J. E. Pegram and A. L. Andrady, Outdoor weathering of selected polymeric materials under marine exposure conditions, *Polym. Degrad. Stab.*, 1989, **26**, 333–345.
- 14 P. K. Kamweru, F. G. Ndiritu, T. K. Kinyanjui, Z. W. Muthui, R. G. Ngumbu and P. M. Odhiambo, Study of Temperature and UV Wavelength Range Effects on Degradation of Photo-Irradiated Polyethylene Films Using DMA, *J. Macromol. Sci. Part B*, 2011, **50**, 1338–1349.

- 15 M. A. Browne, T. Galloway and R. Thompson, Microplastic-an emerging contaminant of potential concern?: Learned Discourses, *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 2007, **3**, 559–561.
- 16 P. L. Corcoran, M. C. Biesinger and M. Grifi, Plastics and beaches: A degrading relationship, *Mar. Pollut. Bull.*, 2009, **58**, 80–84.
- 17 D. A. Cooper and P. L. Corcoran, Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii, *Mar. Pollut. Bull.*, 2010, **60**, 650–654.
- 18 A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed and S. Ahmed, Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 246–265.
- 19 I. Gestoso, E. Cacabelos, P. Ramalhosa and J. Canning-Clode, Plasticrusts: A new potential threat in the Anthropocene’s rocky shores, *Sci. Total Environ.*, 2019, **687**, 413–415.
- 20 J. Zalasiewicz, C. N. Waters, J. A. Ivar do Sul, P. L. Corcoran, A. D. Barnosky, A. Cearreta, M. Edgeworth, A. Gałuszka, C. Jeandel, R. Leinfelder, J. R. McNeill, W. Steffen, C. Summerhayes, M. Wagemich, M. Williams, A. P. Wolfe and Y. Yonan, The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene, *Anthropocene*, 2016, **13**, 4–17.
- 21 E. J. Carpenter and K. L. Smith, Plastics on the Sargasso Sea Surface, *Science*, 1972, **175**, 1240–1241.
- 22 J. B. Colton, B. R. Burns and F. D. Knapp, Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic: The abundance, distribution, source, and significance of various types of plastics are discussed., *Science*, 1974, **185**, 491–497.
- 23 J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan and K. L. Law, Plastic waste inputs from land into the ocean, *Science*, 2015, **347**, 768–771.
- 24 R. C. Thompson, Lost at Sea: Where Is All the Plastic?, *Science*, 2004, **304**, 838–838.
- 25 J. A. Ivar do Sul, Â. Spengler and M. F. Costa, Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic), *Mar. Pollut. Bull.*, 2009, **58**, 1236–1238.
- 26 L. D. K. Kanhai, K. Gårdfeldt, O. Lyashevskaya, M. Hassellöv, R. C. Thompson and I. O’Connor, Microplastics in sub-surface waters of the Arctic Central Basin, *Mar. Pollut. Bull.*, 2018, **130**, 8–18.
- 27 A. Cózar, E. Martí, C. M. Duarte, J. García-de-Lomas, E. van Sebille, T. J. Ballatore, V. M. Eguíluz, J. I. González-Gordillo, M. L. Pedrotti, F. Echevarría, R. Troublè and X. Irigoien, The Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation, *Sci. Adv.*, 2017, **3**, e1600582.
- 28 A. L. Lusher, V. Tirelli, I. O’Connor and R. Officer, Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 14947.

- 
- 29 D. K. A. Barnes, A. Walters and L. Gonçalves, Macroplastics at sea around Antarctica, *Mar. Environ. Res.*, 2010, **70**, 250–252.
- 30 A. Isobe, K. Uchiyama-Matsumoto, K. Uchida and T. Tokai, Microplastics in the Southern Ocean, *Mar. Pollut. Bull.*, 2017, **114**, 623–626.
- 31 A. L. d. F. Lacerda, L. dos S. Rodrigues, E. van Sebille, F. L. Rodrigues, L. Ribeiro, E. R. Secchi, F. Kessler and M. C. Proietti, Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 3977.
- 32 V. Fischer, N. O. Elsner, N. Brenke, E. Schwabe and A. Brandt, Plastic pollution of the Kuril–Kamchatka Trench area (NW Pacific), *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 2015, **111**, 399–405.
- 33 R. M. Blair, S. Waldron, V. Phoenix and C. Gauchotte-Lindsay, Micro- and Nanoplastic Pollution of Freshwater and Wastewater Treatment Systems, *Springer Sci. Rev.*, 2017, **5**, 19–30.
- 34 P. Kay, R. Hiscoe, I. Moberley, L. Bajic and N. McKenna, Wastewater treatment plants as a source of microplastics in river catchments, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2018, **25**, 20264–20267.
- 35 A. E. Christian and I. Köper, Microplastics in biosolids: A review of ecological implications and methods for identification, enumeration, and characterization, *Sci. Total Environ.*, 2023, **864**, 161083.
- 36 M. Eriksen, S. Mason, S. Wilson, C. Box, A. Zellers, W. Edwards, H. Farley and S. Amato, Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes, *Mar. Pollut. Bull.*, 2013, **77**, 177–182.
- 37 A. K. Baldwin, S. R. Corsi and S. A. Mason, Plastic Debris in 29 Great Lakes Tributaries: Relations to Watershed Attributes and Hydrology, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 10377–10385.
- 38 A. Ballent, P. L. Corcoran, O. Madden, P. A. Helm and F. J. Longstaffe, Sources and sinks of microplastics in Canadian Lake Ontario nearshore, tributary and beach sediments, *Mar. Pollut. Bull.*, 2016, **110**, 383–395.
- 39 M. Zbyszewski and P. L. Corcoran, Distribution and Degradation of Fresh Water Plastic Particles Along the Beaches of Lake Huron, Canada, *Water. Air. Soil Pollut.*, 2011, **220**, 365–372.
- 40 M. Zbyszewski, P. L. Corcoran and A. Hockin, Comparison of the distribution and degradation of plastic debris along shorelines of the Great Lakes, North America, *J. Gt. Lakes Res.*, 2014, **40**, 288–299.
- 41 D. M. Mitrano, A. Beltzung, S. Frehland, M. Schmiedgruber, A. Cingolani and F. Schmidt, Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems, *Nat. Nanotechnol.*, 2019, **14**, 362–368.
- 42 A. Wahl, C. Le Juge, M. Davranche, H. El Hadri, B. Grassl, S. Reynaud and J. Gigault, Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris, *Chemosphere*, 2021, **262**, 127784.

- 43 M. Bergmann, V. Wirzberger, T. Krumpfen, C. Lorenz, S. Primpke, M. B. Tekman and G. Gerdt, High Quantities of Microplastic in Arctic Deep-Sea Sediments from the HAUSGARTEN Observatory, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 11000–11010.
- 44 C. Munari, V. Infantini, M. Scoconi, E. Rastelli, C. Corinaldesi and M. Mistri, Microplastics in the sediments of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica), *Mar. Pollut. Bull.*, 2017, **122**, 161–165.
- 45 R. W. Obbard, S. Sadri, Y. Q. Wong, A. A. Khitun, I. Baker and R. C. Thompson, Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice, *Earths Future*, 2014, **2**, 315–320.
- 46 A. Pradel, M. Gautier, D. Bavay, and J. Gigault, Micro- and nanoplastic transfer in freezing saltwater: implications for their fate in polar waters, *Environ. Sci. Process. Impacts*, 2021, **23**, 1759–1770.
- 47 I. Peeken, S. Primpke, B. Beyer, J. Gütermann, C. Katlein, T. Krumpfen, M. Bergmann, L. Hehemann and G. Gerdt, Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1505.
- 48 S. Allen, D. Allen, F. Baladima, V. R. Phoenix, J. L. Thomas, G. Le Roux and J. E. Sonke, Evidence of free tropospheric and long-range transport of microplastic at Pic du Midi Observatory, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 7242.
- 49 M. C. Goldstein and D. S. Goodwin, Gooseneck barnacles (*Lepas* spp.) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre, *PeerJ*, 2013, **1**, e184.
- 50 K. Mattsson, S. Jovic, I. Doverbratt and L.-A. Hansson, in *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, Elsevier, 2018, pp. 379–399.
- 51 E. Huerta Lwanga, J. Mendoza Vega, V. Ku Quej, J. de los A. Chi, L. Sanchez del Cid, C. Chi, G. Escalona Segura, H. Gertsen, T. Salánki, M. van der Ploeg, A. A. Koelmans and V. Geissen, Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 14071.
- 52 S. Kühn and J. A. van Franeker, Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna, *Mar. Pollut. Bull.*, 2020, **151**, 110858.
- 53 R. Lenz, K. Enders and T. G. Nielsen, Microplastic exposure studies should be environmentally realistic, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, E4121–E4122.
- 54 Y. Li, Y. Ye, N. Rihan, Q. Jiang, X. Liu, Y. Zhao and X. Che, Polystyrene nanoplastics decrease nutrient accumulation, disturb sex hormones, and inhibit reproductive development in juvenile *Macrobrachium nipponense*, *Sci. Total Environ.*, 2023, **891**, 164481.
- 55 S. C. Gall and R. C. Thompson, The impact of debris on marine life, *Mar. Pollut. Bull.*, 2015, **92**, 170–179.
- 56 H. S. Charlton-Howard, A. L. Bond, J. Rivers-Auty and J. L. Lavers, ‘Plasticosis’: Characterising macro- and microplastic-associated fibrosis in seabird tissues, *J. Hazard. Mater.*, 2023, **450**, 131090.

- 
- 57 R.-T. Wu, Y.-F. Cai, Y.-X. Chen, Y.-W. Yang, S.-C. Xing and X.-D. Liao, Occurrence of microplastic in livestock and poultry manure in South China, *Environ. Pollut.*, 2021, **277**, 116790.
- 58 R.-T. Wu, Y.-F. Cai, S.-C. Xing, Y.-W. Yang, J.-D. Mi and X.-D. Liao, A novel method for extraction of polypropylene microplastics in swine manure, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021, **28**, 13021–13030.
- 59 N. Beriot, J. Peek, R. Zornoza, V. Geissen and E. Huerta Lwanga, Low density-microplastics detected in sheep faeces and soil: A case study from the intensive vegetable farming in Southeast Spain, *Sci. Total Environ.*, 2021, **755**, 142653.
- 60 I. Azeem, M. Adeel, M. A. Ahmad, N. Shakoor, G. D. Jiangcuo, K. Azeem, M. Ishfaq, A. Shakoor, M. Ayaz, M. Xu and Y. Rui, Uptake and Accumulation of Nano/Microplastics in Plants: A Critical Review, *Nanomaterials*, 2021, **11**, 2935.
- 61 Z. Hua, S. Ma, Z. Ouyang, P. Liu, H. Qiang and X. Guo, The review of nanoplastics in plants: Detection, analysis, uptake, migration and risk, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2023, **158**, 116889.
- 62 J. Zhang, L. Wang, L. Trasande and K. Kannan, Occurrence of Polyethylene Terephthalate and Polycarbonate Microplastics in Infant and Adult Feces, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2021, **8**, 989–994.
- 63 A. Ragusa, V. Notarstefano, A. Svelato, A. Belloni, G. Gioacchini, C. Blondeel, E. Zucchelli, C. De Luca, S. D’Avino, A. Gulotta, O. Carnevali and E. Giorgini, Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk, *Polymers*, 2022, **14**, 2700.
- 64 A. Ragusa, A. Svelato, C. Santacroce, P. Catalano, V. Notarstefano, O. Carnevali, F. Papa, M. C. A. Rongioletti, F. Baiocco, S. Draghi, E. D’Amore, D. Rinaldo, M. Matta and E. Giorgini, Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, *Environ. Int.*, 2021, **146**, 106274.
- 65 H. A. Leslie, M. J. M. van Velzen, S. H. Brandsma, A. D. Vethaak, J. J. Garcia-Vallejo and M. H. Lamoree, Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood, *Environ. Int.*, 2022, **163**, 107199.
- 66 E. R. Zettler, T. J. Mincer and L. A. Amaral-Zettler, Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 7137–7146.
- 67 J. Astudillo, M. Bravo, C. Dumont and M. Thiel, Detached aquaculture buoys in the SE Pacific: potential dispersal vehicles for associated organisms, *Aquat. Biol.*, 2009, **5**, 219–231.
- 68 D. Barnes and K. Fraser, Rafting by five phyla on man-made flotsam in the Southern Ocean, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2003, **262**, 289–291.
- 69 M. Bravo, J. Astudillo, D. Lancellotti, G. Luna-Jorquera, N. Valdivia and M. Thiel, Rafting on abiotic substrata: properties of floating items and their influence on community succession, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2011, **439**, 1–17.

- 70 M. R. Gregory, Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 2009, **364**, 2013–2025.
- 71 H. K. Webb, R. J. Crawford, T. Sawabe and E. P. Ivanova, Poly(ethylene terephthalate) Polymer Surfaces as a Substrate for Bacterial Attachment and Biofilm Formation, *Microbes Environ.*, 2009, **24**, 39–42.
- 72 S. Reynaud, A. Aynard, B. Grassl and J. Gigault, Nanoplastics: From model materials to colloidal fate, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2022, **57**, 101528.
- 73 M. Kedzierski, D. Cirederf-Boulant, M. Palazot, M. Yvin and S. Bruzard, Continents of plastics: An estimate of the stock of microplastics in agricultural soils, *Sci. Total Environ.*, 2023, **880**, 163294.
- 74 A. A. Koelmans, N. H. Mohamed Nor, E. Hermsen, M. Kooi, S. M. Mintenig and J. De France, Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality, *Water Res.*, 2019, **155**, 410–422.
- 75 Campanale, Massarelli, Savino, Locaputo, and Uricchio, A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, **17**, 1212.
- 76 A. Turner and L. A. Holmes, Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh water, *Environ. Chem.*, 2015, **12**, 600.
- 77 M. Davranche, C. Veclin, A.-C. Pierson-Wickmann, H. El Hadri, B. Grassl, L. Roweczyk, A. Dia, A. Ter Halle, F. Blancho, S. Reynaud and J. Gigault, Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example, *Environ. Pollut.*, 2019, **249**, 940–948.
- 78 K. Zhang, J. Su, X. Xiong, X. Wu, C. Wu and J. Liu, Microplastic pollution of lakeshore sediments from remote lakes in Tibet plateau, China, *Environ. Pollut.*, 2016, **219**, 450–455.
- 79 J. Guan, K. Qi, J. Wang, W. Wang, Z. Wang, N. Lu and J. Qu, Microplastics as an emerging anthropogenic vector of trace metals in freshwater: Significance of biofilms and comparison with natural substrates, *Water Res.*, 2020, **184**, 116205.
- 80 Aynard, A, *Elaboration de nanoplastiques modèles avec et sans marquage par polymérisation en milieu dispersé et étude de leurs comportements avec des polluants. Thèse de doctorat*, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2022.
- 81 L. Pessonj, C. Veclin, H. El Hadri, C. Cugnet, M. Davranche, A.-C. Pierson-Wickmann, J. Gigault, B. Grassl and S. Reynaud, Soap- and metal-free polystyrene latex particles as a nanoplastic model, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 2253–2258.
- 82 J. C. Prata, V. Reis, J. T. V. Matos, J. P. da Costa, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos, A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT), *Sci. Total Environ.*, 2019, **690**, 1277–1283.

- 
- 83 A. Ter Halle, L. Jeanneau, M. Martignac, E. Jardé, B. Pedrono, L. Brach and J. Gigault, Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 13689–13697.
- 84 J. A. Gallego-Urrea, J. Tuoriniemi, T. Pallander and M. Hassellöv, Measurements of nanoparticle number concentrations and size distributions in contrasting aquatic environments using nanoparticle tracking analysis, *Environ. Chem.*, 2010, **7**, 67.
- 85 C. Schwaferts, R. Niessner, M. Elsner and N. P. Ivleva, Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2019, **112**, 52–65.
- 86 R. Gillibert, G. Balakrishnan, Q. Deshoules, M. Tardivel, A. Magazzù, M. G. Donato, O. M. Maragò, M. Lamy De La Chapelle, F. Colas, F. Lagarde and P. G. Gucciardi, Raman Tweezers for Small Microplastics and Nanoplastics Identification in Seawater, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 9003–9013.
- 87 S. M. Mintenig, M. G. J. Löder, S. Primpke and G. Gerdt, Low numbers of microplastics detected in drinking water from ground water sources, *Sci. Total Environ.*, 2019, **648**, 631–635.
- 88 S. Primpke, R. K. Cross, S. M. Mintenig, M. Simon, A. Vianello, G. Gerdt and J. Vollertsen, Toward the Systematic Identification of Microplastics in the Environment: Evaluation of a New Independent Software Tool (siMPle) for Spectroscopic Analysis, *Appl. Spectrosc.*, 2020, **74**, 1127–1138.
- 89 A. Käßler, D. Fischer, S. Oberbeckmann, G. Schernewski, M. Labrenz, K.-J. Eichhorn and B. Voit, Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 8377–8391.
- 90 J.-L. Xu, K. V. Thomas, Z. Luo and A. A. Gowen, FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2019, **119**, 115629.
- 91 S. Primpke, S. H. Christiansen, W. Cowger, H. De Frond, A. Deshpande, M. Fischer, E. B. Holland, M. Meyns, B. A. O'Donnell, B. E. Ossmann, M. Pittroff, G. Sarau, B. M. Scholz-Böttcher and K. J. Wiggin, Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost-Efficient Analysis of Microplastics, *Appl. Spectrosc.*, 2020, **74**, 1012–1047.
- 92 L. Hermabessiere, C. Himber, B. Boricaud, M. Kazour, R. Amara, A.-L. Cassone, M. Laurentie, I. Paul-Pont, P. Soudant, A. Dehaut and G. Duflos, Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**, 6663–6676.
- 93 E. Fries, J. H. Dekiff, J. Willmeyer, M.-T. Nuelle, M. Ebert and D. Remy, Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy, *Environ. Sci. Process. Impacts*, 2013, **15**, 1949.

- 94 M. Fischer and B. M. Scholz-Böttcher, 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.
- 95 E. Dümichen, A.-K. Barthel, U. Braun, C. G. Bannick, K. Brand, M. Jekel and R. Senz, Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method, *Water Res.*, 2015, **85**, 451–457.
- 96 I. Acosta-Coley, D. Mendez-Cuadro, E. Rodriguez-Cavallo, J. de la Rosa and J. Olivero-Verbel, Trace elements in microplastics in Cartagena: A hotspot for plastic pollution at the Caribbean, *Mar. Pollut. Bull.*, 2019, **139**, 402–411.
- 97 J. Wang, J. Peng, Z. Tan, Y. Gao, Z. Zhan, Q. Chen and L. Cai, Microplastics in the surface sediments from the Beijiang River littoral zone: Composition, abundance, surface textures and interaction with heavy metals, *Chemosphere*, 2017, **171**, 248–258.
- 98 C. Catrouillet, M. Davranche, I. Khatib, C. Fauny, A. Wahl and J. Gigault, Metals in microplastics: determining which are additive, adsorbed, and bioavailable, *Environ. Sci. Process. Impacts*, 2021, 10.1039.D1EM00017A.
- 99 H. El Hadri, J. Gigault, S. Mounicou, B. Grassl and S. Reynaud, Trace element distribution in marine microplastics using laser ablation-ICP-MS, *Mar. Pollut. Bull.*, 2020, **160**, 111716.
- 100 A. Aynard, C. Courrèges, J. Jiménez-Lamana, A. Raad, C. Miqueu, B. Grassl and S. Reynaud, Trace metal sorption on nanoplastics: An innovative analytical approach combining surface analysis and mass spectrometry techniques, *Environ. Pollut.*, 2023, **323**, 121229.
- 101 A. Barber, S. Kly, M. G. Moffitt, L. Rand and J. F. Ranville, Coupling single particle ICP-MS with field-flow fractionation for characterizing metal nanoparticles contained in nanoplastic colloids, *Environ. Sci. Nano*, 2020, **7**, 514–524.
- 102 J. Jiménez-Lamana, L. Marigliano, J. Allouche, B. Grassl, J. Szpunar and S. Reynaud, A Novel Strategy for the Detection and Quantification of Nanoplastics by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 11664–11672.
- 103 N. Von Moos, P. Burkhardt-Holm and A. Köhler, Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 11327–11335.
- 104 C. Della Torre, E. Bergami, A. Salvati, C. Faleri, P. Cirino, K. A. Dawson and I. Corsi, Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 12302–12311.
- 105 O. Pikuda, E. G. Xu, D. Berk and N. Tufenkji, Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2019, **6**, 21–25.

- 
- 106 R. Sussarellu, M. Suquet, Y. Thomas, C. Lambert, C. Fabioux, M. E. J. Pernet, N. Le Goïc, V. Quillien, C. Mingant, Y. Epelboin, C. Corporeau, J. Guyomarch, J. Robbens, I. Paul-Pont, P. Soudant and A. Huvet, Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 2430–2435.
- 107 H. El Hadri, J. Gigault, B. Maxit, B. Grassl and S. Reynaud, Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments, *NanoImpact*, 2020, **17**, 100206.
- 108 S. V. Facchetti, R. La Spina, F. Fumagalli, N. Riccardi, D. Gilliland and J. Ponti, Detection of Metal-Doped Fluorescent PVC Microplastics in Freshwater Mussels, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 2363.
- 109 M. Akbulut, P. Ginart, M. E. Gindy, C. Theriault, K. H. Chin, W. Soboyejo and R. K. Prud'homme, Generic Method of Preparing Multifunctional Fluorescent Nanoparticles Using Flash NanoPrecipitation, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 718–725.
- 110 M. Al-Sid-Cheikh, S. J. Rowland, K. Stevenson, C. Rouleau, T. B. Henry and R. C. Thompson, Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 14480–14486.
- 111 L. Tian, Q. Chen, W. Jiang, L. Wang, H. Xie, N. Kalogerakis, Y. Ma and R. Ji, A carbon-14 radiotracer-based study on the phototransformation of polystyrene nanoplastics in water versus in air, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 2907–2917.
- 112 M. Sander, H.-P. E. Kohler and K. McNeill, Assessing the environmental transformation of nanoplastic through <sup>13</sup>C-labelled polymers, *Nat. Nanotechnol.*, 2019, **14**, 301–303.
- 113 M. T. Zumstein, A. Schintlmeister, T. F. Nelson, R. Baumgartner, D. Wuebken, M. Wagner, H.-P. E. Kohler, K. McNeill and M. Sander, Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass, *Sci. Adv.*, 2018, **4**, eaas9024.
- 114 M. Schmiedgruber, R. Hufenus and D. M. Mitrano, Mechanistic understanding of microplastic fiber fate and sampling strategies: Synthesis and utility of metal doped polyester fibers, *Water Res.*, 2019, **155**, 423–430.
- 115 Q. Gao, Y. Wang, Y. Ji, X. Zhao, P. Zhang and L. Chen, Tracking of realistic nanoplastics in complicated matrices by iridium element labeling and inductively coupled plasma mass spectroscopy, *J. Hazard. Mater.*, 2022, **424**, 127628.
- 116 Y. Luo, L. Li, Y. Feng, R. Li, J. Yang, W. J. G. M. Peijnenburg and C. Tu, Quantitative tracing of uptake and transport of submicrometre plastics in crop plants using lanthanide chelates as a dual-functional tracer, *Nat. Nanotechnol.*, 2022, **17**, 424–431.
- 117 R. J. Rauschendorfer, K. M. Whitham, S. Summer, S. A. Patrick, A. E. Pierce, H. Sefi-Cyr, S. Tadjiki, M. D. Kraft, S. R. Emory, D. A. Rider and M. D. Montañó, Development and Application of

- Nanoparticle-Nanopolymer Composite Spheres for the Study of Environmental Processes, *Front. Toxicol.*, 2021, **3**, 752296.
- 118 D. Cassano, A. Bogni, R. La Spina, D. Gilliland and J. Ponti, Investigating the Cellular Uptake of Model Nanoplastics by Single-Cell ICP-MS, *Nanomaterials*, 2023, **13**, 594.
- 119 M. Tamayo-Belda, A. V. Pérez-Olivares, G. Pulido-Reyes, K. Martin-Betancor, M. González-Pleiter, F. Leganés, D. M. Mitrano, R. Rosal and F. Fernández-Piñas, Tracking nanoplastics in freshwater microcosms and their impacts to aquatic organisms, *J. Hazard. Mater.*, 2023, **445**, 130625.
- 120 N. J. Clark, F. R. Khan, C. Crowther, D. M. Mitrano and R. C. Thompson, Uptake, distribution and elimination of palladium-doped polystyrene nanoplastics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following dietary exposure, *Sci. Total Environ.*, 2023, **854**, 158765.
- 121 F. Ribeiro, D. M. Mitrano, C. Hacker, P. Cherek, K. Brigden, S. L. Kaserzon, K. V. Thomas and T. S. Galloway, Short Depuration of Oysters Intended for Human Consumption Is Effective at Reducing Exposure to Nanoplastics, *Environ. Sci. Technol.*, 2022, **56**, 16716–16725.
- 122 N. J. Clark, F. R. Khan, D. M. Mitrano, D. Boyle and R. C. Thompson, Demonstrating the translocation of nanoplastics across the fish intestine using palladium-doped polystyrene in a salmon gut-sac, *Environ. Int.*, 2022, **159**, 106994.
- 123 P. E. Redondo-Hasselerharm, G. Vink, D. M. Mitrano and A. A. Koelmans, Metal-doping of nanoplastics enables accurate assessment of uptake and effects on *Gammarus pulex*, *Environ. Sci. Nano*, 2021, **8**, 1761–1770.
- 124 M. Holzer, D. M. Mitrano, L. Carles, B. Wagner and A. Tlili, Important ecological processes are affected by the accumulation and trophic transfer of nanoplastics in a freshwater periphyton-grazer food chain, *Environ. Sci. Nano*, 2022, **9**, 2990–3003.
- 125 A. E. P. del Real, D. M. Mitrano, H. Castillo-Michel, M. Wazne, J. Reyes-Herrera, E. Bortel, B. Hesse, J. Villanova and G. Sarret, Assessing implications of nanoplastics exposure to plants with advanced nanometrology techniques, *J. Hazard. Mater.*, 2022, **430**, 128356.
- 126 G. Pulido-Reyes, L. Magherini, C. Bianco, R. Sethi, U. von Gunten, R. Kaegi and D. M. Mitrano, Nanoplastics removal during drinking water treatment: Laboratory- and pilot-scale experiments and modeling, *J. Hazard. Mater.*, 2022, **436**, 129011.
- 127 M. Eriksen, W. Cowger, L. M. Erdle, S. Coffin, P. Villarrubia-Gómez, C. J. Moore, E. J. Carpenter, R. H. Day, M. Thiel and C. Wilcox, A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans—Urgent solutions required, *PLOS ONE*, 2023, **18**, e0281596.
- 128 N. P. Ivleva, Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives, *Chem. Rev.*, 2021, **121**, 11886–11936.

- 
- 129 H. Cai, E. G. Xu, F. Du, R. Li, J. Liu and H. Shi, Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges, *Chem. Eng. J.*, 2021, **410**, 128208.
- 130 G. Balakrishnan, M. Déniel, T. Nicolai, C. Chassenieux and F. Lagarde, Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 315–324.
- 131 K. D. Sullivan and V. Gugliada, Fluorescence photobleaching of microplastics: A cautionary tale, *Mar. Pollut. Bull.*, 2018, **133**, 622–625.
- 132 A. I. Catarino, A. Frutos and T. B. Henry, Use of fluorescent-labelled nanoplastics (NPs) to demonstrate NP absorption is inconclusive without adequate controls, *Sci. Total Environ.*, 2019, **670**, 915–920.
- 133 C. J. M. Rivas, Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 2017, **16**.
- 134 P. A. Lovell and M. S. El-Aasser, Eds., *Emulsion polymerization and emulsion polymers*, J. Wiley, New York, 1997.
- 135 B. Eren and Y. Solmaz, Preparation and properties of negatively charged styrene acrylic latex particles cross-linked with divinylbenzene, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2020, **141**, 1331–1339.
- 136 W. V. Smith and R. H. Ewart, Kinetics of Emulsion Polymerization, *J. Chem. Phys.*, 1948, **16**, 592–599.
- 137 K. H. Lee, H. Y. Kim, H. J. Bang, Y. H. Jung and S. G. Lee, The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers, *Polymer*, 2003, **44**, 4029–4034.
- 138 G. Mendas, V. Drevenkar and L. Zupancic-Kralj, Solid-phase extraction with styrene–divinylbenzene sorbent for high-performance liquid or gas chromatographic determination of urinary chloro- and methylthiotriazines, *J Chromatogr A*.
- 139 H. Ning, Y. Fan, H. Liu, Z. Huang, X. Ke, Y. Xu and Y. She, Preparation and application of polystyrene-divinylbenzene sorbent with weak cation-exchange character for the selective extraction of illicit drugs in environmental water, *J. Chromatogr. A*, 2022, **1671**, 462994.
- 140 V. Raks, H. Al-Suod and B. Buszewski, Isolation, Separation, and Preconcentration of Biologically Active Compounds from Plant Matrices by Extraction Techniques, *Chromatographia*, 2018, **81**, 189–202.
- 141 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, 2020, **169**, 105883.
- 142 P. Zhao, N. Li and D. Astruc, State of the art in gold nanoparticle synthesis, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 638–665.

- 143 R. Allabashi, W. Stach, A. de la Escosura-Muñiz, L. Liste-Calleja and A. Merkoçi, ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving, *J. Nanoparticle Res.*, 2009, **11**, 2003–2011.
- 144 H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.*, 1989, **55**, R1–R4.
- 145 C. Zhao, S. Melis, E. P. Hughes, T. Li, X. Zhang, P. D. Olmsted and E. Van Keuren, Particle Formation Mechanisms in the Nanoprecipitation of Polystyrene, *Langmuir*, 2020, **36**, 13210–13217.
- 146 C. Mawele Loudy, J. Allouche, A. Bousquet, C. Courrèges, H. Martinez and L. Billon, Core@Corona Functional Nanoparticle-Driven Rod–Coil Diblock Copolymer Self-Assembly, *Langmuir*, 2019, **35**, 16925–16934.
- 147 J. Turkevich, P. C. Stevenson and J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55.
- 148 I. Ojea-Jiménez, F. M. Romero, N. G. Bastús and V. Puentes, Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 1800–1804.
- 149 S. Link and M. A. El-Sayed, Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 4212–4217.
- 150 F. Lince, D. L. Marchisio and A. A. Barresi, Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **322**, 505–515.
- 151 I. Y. Perevyazko, A. Vollrath, C. Pietsch, S. Schubert, G. M. Pavlov and U. S. Schubert, Nanoprecipitation of poly(methyl methacrylate)-based nanoparticles: Effect of the molar mass and polymer behavior, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, 2012, **50**, 2906–2913.
- 152 J. Gigault, H. El Hadri, S. Reynaud, E. Deniau and B. Grassl, Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 6761–6769.
- 153 H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2011, **9**.
- 154 E. Kühnel, D. D. P. Laffan, G. C. Lloyd-Jones, T. Martínez del Campo, I. R. Shepperson and J. L. Slaughter, Mechanism of Methyl Esterification of Carboxylic Acids by Trimethylsilyldiazomethane, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 7075–7078.
- 155 L. Lebreton and A. Andrady, Future scenarios of global plastic waste generation and disposal, *Palgrave Commun.*, 2019, **5**, 6–17.

- 
- 156 N. Khalid, M. Aqeel, A. Noman, S. M. Khan and N. Akhter, Interactions and effects of microplastics with heavy metals in aquatic and terrestrial environments, *Environ. Pollut.*, 2021, **290**, 118104.
- 157 A. Turner and M. Filella, Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts, *Environ. Int.*, 2021, **156**, 106622.
- 158 L. A. Holmes, A. Turner and R. C. Thompson, Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment, *Environ. Pollut.*, 2012, **160**, 42–48.
- 159 C. M. Rochman, M. A. Browne, A. J. Underwood, J. A. van Franeker, R. C. Thompson and L. A. Amaral-Zettler, The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived, *Ecology*, 2016, **97**, 302–312.
- 160 W.-X. Wang and P. S. Rainbow, Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, 2008, **148**, 315–323.
- 161 A. Menéndez-Pedriz and J. Jaumot, Interaction of Environmental Pollutants with Microplastics: A Critical Review of Sorption Factors, Bioaccumulation and Ecotoxicological Effects, *Toxics*, 2020, **8**, 40.
- 162 G. M. Gadd and A. J. Griffiths, Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microb. Ecol.*, 1977, **4**, 303–317.
- 163 G. Kutralam-Muniasamy, Overview of microplastics pollution with heavy metals: Analytical methods, occurrence, transfer risks and call for standardization, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **14**.
- 164 W. V. Borm, A. Lamberty and Ph. Quevauviller, Collaborative study to improve the quality control of trace element determinations in polymers. Part 1. Interlaboratory study, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, **365**, 361–363.
- 165 L. Feng, L. Ma, J. Wang and H. Lu, Certification of reference materials for Cd, Cr, Hg and Pb in polypropylene, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 3051–3057.
- 166 P. J. Fordham, J. W. Gramshaw, L. Castle, H. M. Crews, D. Thompson, S. J. Parry and E. McCurdy, Determination of trace elements in food contact polymers by semi-quantitative inductively coupled plasma mass spectrometry. Performance evaluation using alternative multi-element techniques and in-house polymer reference materials, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 303.
- 167 K. J. Lee, Y. J. Lee, Y. R. Choi, J. S. Kim, Y. S. Kim and S. B. Heo, Development of new reference materials for the determination of cadmium, chromium, mercury and lead in polycarbonate, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **758**, 19–27.
- 168 C. Mans, S. Hanning, C. Simons, A. Wegner, A. Janßen and M. Kreyenschmidt, Development of suitable plastic standards for X-ray fluorescence analysis, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, 2007, **62**, 116–122.

- 169 C. Mans, C. Simons, S. Hanning, A. Janßen, D. Alber, M. Radtke, U. Reinholz, A. Bühler and M. Kreyenschmidt, New polymeric candidate reference materials for XRF and LA-ICP-MS-development and preliminary characterization, *X-Ray Spectrom.*, 2009, **38**, 52–57.
- 170 M. Ohata and A. Hioki, Development of PVC and PP resin pellet certified reference materials for heavy metal analysis with respect to the RoHS directive, *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, 2013, **29**, 239–246.
- 171 A. Lamberty, W. Van Borm and P. Quevauviller, Collaborative study to improve the quality control of trace element determinations in polymers. Part 2. Certification of polyethylene reference materials (CRMs 680 and 681) for As, Br, Cd, Cl, Cr, Hg, Pb, and S content, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 811–818.
- 172 J. Pauwels, A. Lamberty, P. De Bièvre, K.-H. Grobecker and C. Bauspiess, Certified reference materials for the determination of cadmium in polyethylene, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, **349**, 409–411.
- 173 C. Simons, S. Hanning, A. Wegner, C. Mans, A. Janßen, M. Kreyenschmidt and J. A. C. Broekaert, Comparative study on the homogeneity of polymeric calibration materials using LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 1038.
- 174 Y. Makino and T. Nakazato, Determination of trace elements in polymers using fsLA-ICP-MS with internal standardization by carbon, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 1895–1899.
- 175 A. D. Forero-López, L. I. Brugnoli, B. Abasto, G. N. Rimondino, V. L. Lassalle, M. G. Arduoso, M. S. Nazzarro, A. M. Martinez, C. V. Spetter, F. Biancalana, and Fernández-Severini, Plasticsphere on microplastics: In situ assays in an estuarine environment, *J. Hazard. Mater.*, 2022, **440**, 129737.
- 176 C. D. Rummel, A. Jahnke, E. Gorokhova, D. Kühnel and M. Schmitt-Jansen, Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2017, **4**, 258–267.
- 177 K. Djaoudi, J. Angel. T. Onrubia, A. Boukra, L. Guesnay, A. Portas, R. Barry-Martinet, B. Angeletti, S. Mounier, V. Lenoble and J.-F. Briand, Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics, *Sci. Total Environ.*, 2022, **814**, 152278.
- 178 Z. Liu, T. M. Adyel, Z. Wang, J. Wu, J. Liu, L. Miao and J. Hou, Effects of Biofilms on Trace Metal Adsorption on Plastics in Freshwater Systems, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022, **19**, 13752.
- 179 H. Richard, E. J. Carpenter, T. Komada, P. T. Palmer and C. M. Rochman, Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters, *Sci. Total Environ.*, 2019, **683**, 600–608.
- 180 U. Rozman, S. Filker and G. Kalčíková, Monitoring of biofilm development and physico-chemical changes of floating microplastics at the air-water interface, *Environ. Pollut.*, 2023, **322**, 121157.

- 
- 181 J. Wang, X. Guo and J. Xue, Biofilm-Developed Microplastics As Vectors of Pollutants in Aquatic Environments, *Environ. Sci. Technol.*, 2021, acs.est.1c04466.
- 182 Y. Wang, X. Wang, Y. Li, J. Li, F. Wang, S. Xia and J. Zhao, Biofilm alters tetracycline and copper adsorption behaviors onto polyethylene microplastics, *Chem. Eng. J.*, 2020, **392**, 123808.
- 183 C. Wu, K. Tanaka, Y. Tani, X. Bi, J. Liu and Q. Yu, Effect of particle size on the colonization of biofilms and the potential of biofilm-covered microplastics as metal carriers, *Sci. Total Environ.*, 2022, **821**, 153265.
- 184 Q. Zhou, C. Tu, Y. Liu, Y. Li, H. Zhang, A. Vogts, S. Plewe, X. Pan, Y. Luo and J. J. Waniek, Biofilm enhances the copper (II) adsorption on microplastic surfaces in coastal seawater: Simultaneous evidence from visualization and quantification, *Sci. Total Environ.*, 2022, **853**, 158217.
- 185 W. Mrozik, M. A. Rajaeifar, O. Heidrich and P. Christensen, Environmental impacts, pollution sources and pathways of spent lithium-ion batteries, *Energy Environ. Sci.*, 2021, **14**, 6099–6121.
- 186 A. Bassères and B. Tramier, Characterisation of the impact of aqueous industrial waste in mesocosms: biological indicators and pilot streams, *Water Sci. Technol.*, 2001, **44**, 135–143.
- 187 S. Sourisseau, A. Bassères, F. Périé and T. Caquet, Calibration, validation and sensitivity analysis of an ecosystem model applied to artificial streams, *Water Res.*, 2008, **42**, 1167–1181.
- 188 U.S. Environmental Protection Agency and Office of Water, Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 2002, 33.
- 189 K. M. Ritalahti, B. K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S. S. Koenigsberg and F. E. Löffler, Quantitative PCR Targeting 16S rRNA and Reductive Dehalogenase Genes Simultaneously Monitors Multiple *Dehalococcoides* Strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 2765–2774.
- 190 I. M. Bradley, A. J. Pinto and J. S. Guest, Design and Evaluation of Illumina MiSeq-Compatible, 18S rRNA Gene-Specific Primers for Improved Characterization of Mixed Phototrophic Communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, **82**, 5878–5891.
- 191 S. Paissé, M. Goñi-Urriza, T. Stadler, H. Budzinski and R. Duran, Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2012, **80**, 77–86.
- 192 P. Pořízka, L. Brunnbauer, M. Porkert, U. Rozman, G. Marolt, D. Holub, M. Kizovský, M. Benešová, O. Samek, A. Limbeck, J. Kaiser and G. Kalčíková, Laser-based techniques: Novel tools for the identification and characterization of aged microplastics with developed biofilm, *Chemosphere*, 2023, **313**, 137373.
- 193 I. V. Kirstein, A. Wichels, G. Krohne and G. Gerdt, Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater - Specific or general?, *Mar. Environ. Res.*, 2018, **142**, 147–154.
- 194 E. Catão C. P., T. Pollet, C. Garnier, R. Barry-Martinet, K. Rehel, I. Linossier, A. Tunin-Ley, J. Turquet and J. Briand, Temperate and tropical coastal waters share relatively similar microbial

- biofilm communities while free-living or particle-attached communities are distinct, *Mol. Ecol.*, 2021, **30**, 2891–2904.
- 195 M. Pinto, T. M. Langer, T. Hüffer, T. Hofmann and G. J. Herndl, The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession, *PLOS ONE*, 2019, **14**, e0217165.
- 196 M. Ogonowski, A. Motiei, K. Ininbergs, E. Hell, Z. Gerdes, K. I. Udekwu, Z. Bacsik and E. Gorokhova, Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics, *Environ. Microbiol.*, 2018, **20**, 2796–2808.
- 197 L. A. Amaral-Zettler, E. R. Zettler and T. J. Mincer, Ecology of the plastisphere, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, **18**, 139–151.



# MICRO- NANOPLASTIQUES ET MÉTAUX : ÉLABORATION DE MODELES ET PROPRIETES DE SORPTION EN MILIEU NATUREL

Depuis les années 1950, le plastique est passé d'un matériau révolutionnaire à une cause majeure de pollution environnementale. Que ce soit volontairement ou bien du fait d'une mauvaise gestion des déchets, des quantités très importantes sont déversées quotidiennement dans les différents compartiments environnementaux. Ces pièces plastiques y subissent des altérations causées par l'interaction avec les milieux : abrasion et rayonnement UV. Les pièces de plastique s'érodent, se cassent, et leurs surfaces s'oxydent. Ces phénomènes conduisent à la formation de micro- nanoplastiques de tailles inférieures à 5 mm et 1  $\mu\text{m}$  respectivement, et les petits débris, du fait de leurs surfaces spécifiques importantes, ont une forte probabilité d'interagir avec les polluants déjà présents dans l'environnement, et en deviennent les vecteurs. Comprendre le comportement de ces micro- nanoplastiques pour mieux en appréhender les risques est donc primordial.

L'échantillonnage des plus petits débris, les nanoplastiques, reste à développer encore aujourd'hui et l'élaboration de modèles en laboratoire est nécessaire pour étudier leurs comportements. Au-delà de répondre aux besoins des développements des méthodes analytiques, les matériaux modèles doivent aussi permettre leurs quantifications et leurs suivis pour répondre aux demandes des expériences en (éco)-toxicologie. Dans ce contexte, l'élaboration de matériaux modèles marqués par des espèces métalliques a été étudiée. Le traceur métallique présente l'avantage d'être facilement identifiable et quantifiable par de nombreuses méthodes analytiques et notamment à des concentrations d'ultra-traces. Nous proposons ainsi plusieurs protocoles de synthèse de nanoplastiques basées sur des procédés de polymérisation en voie dispersée aqueuse (émulsion) sans utilisation de tensio-actifs ou par nanopréciipitation, et marqués avec des métaux ioniques ou particulaires. Le premier protocole repose sur le piégeage de cuivre ionique par sorption dans des modèles de nanoplastiques réticulés tandis que le deuxième repose sur l'encapsulation de nanoparticules d'or dans des nanoplastiques par un procédé de nanopréciipitation. Après purification de ces modèles, le marquage a été quantifié par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (SP-ICP-MS), les morphologies ont été visualisées par microscopie électronique à transmission (TEM) et à balayage (SEM) et les phénomènes de désorption ont été quantifiés.

En parallèle de ces travaux, les propriétés de sorption des métaux par les microplastiques ont été étudiées. Nos recherches se sont axées sur l'étude de l'adsorption de cobalt dans différents types de microplastiques (PE, PP et PS) lors d'une expérience *in situ* réalisée dans des rivières pilotes. La quantification des métaux a été réalisée avec des techniques analytiques permettant l'analyse totale (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif, ICP-MS) et également en surface (ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif, LA-ICP-MS). Pour cette dernière technique, des étalons plastiques permettant de calibrer le signal analytique en concentrations ont été développés. Ce développement repose sur l'exposition de nanoplastiques modèles à des concentrations croissantes en sel métallique puis à la purification, au séchage et au moulage conduisant à la synthèse d'étalons calibrés en concentration. Alors que les analyses en ICP-MS ont montré que les microplastiques ont adsorbé du cobalt, les analyses en LA-ICP-MS ont permis de déterminer les profils de concentration du cobalt en profondeur dans les échantillons. Ces dernières analyses, couplées à la visualisation de la surface des échantillons par SEM ont révélé le rôle essentiel que jouent les biofilms dans les capacités d'adsorption des microplastiques.

**Mots-clés : Nanoplastique, Microplastique, Environnement, Métal, Modèle**

Since the 1950s, plastic has gone from being a revolutionary material to a major cause of environmental pollution. Whether deliberately or as a result of poor waste management, very large quantities are dumped into the various environmental compartments on a daily basis. These plastic parts undergo alterations caused by interaction with the environment: abrasion and UV radiation. Plastic parts erode, break and their surfaces oxidise. These phenomena lead to the formation of micro-nanoplastics with sizes of less than 5 mm and 1  $\mu\text{m}$  respectively. Because of their large specific surface areas, these small debris have a high probability of interacting with pollutants already present in the environment and become their vectors. It is therefore vital to understand the behaviour of these micro-nanoplastics in order to gain a better grasp of the risks involved.

Sampling of the smallest debris, nanoplastics, has yet to be developed, and laboratory models are needed to study their behaviour. In addition to meeting the needs of analytical method development, model materials must also be able to be quantified and monitored to meet the demands of (eco)-toxicology experiments. In this context, the development of model materials labelled with metallic species was studied. Metallic tracers have the advantage of being easily identifiable and quantifiable by numerous analytical methods, particularly at ultra-trace concentrations. We propose several protocols for the synthesis of nanoplastics based on surfactant-free aqueous dispersion polymerisation (emulsion) or nanoprecipitation and labelled with ionic or particulate metals. The first protocol is based on the trapping of ionic copper by sorption in cross-linked nanoplastic models, while the second is based on the encapsulation of gold nanoparticles in nanoplastics using a nanoprecipitation process. After purification of these models, the labelling was quantified by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS), the morphologies were visualised by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), and the desorption phenomena were quantified.

In parallel with this work, the sorption properties of metals by microplastics were studied. Our research focused on the study of cobalt adsorption in different types of microplastics (PE, PP and PS) during an *in-situ* experiment carried out in pilot rivers. Metals were quantified using analytical techniques that allow for total analysis (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) and surface analysis (laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, LA-ICP-MS). For the latter technique, plastic standards were developed to calibrate the analytical signal in terms of concentration. This development is based on the exposure of nanoplastics model materials to increasing concentrations of metal salt, followed by purification, drying and moulding, leading to the synthesis of concentration-calibrated plastic standards. While ICP-MS analyses showed that the microplastics adsorbed cobalt, LA-ICP-MS analyses determined the depth profiles of cobalt in the samples. These latter analyses, coupled with SEM visualisation of the sample surface, revealed the essential role played by biofilms in the adsorption capacity of microplastics.

**Keywords: Nanoplastic, Microplastic, Environment, Metal, Model material**