



**HAL**  
open science

# Nanoplastiques modèles marqués aux isotopes stables : synthèse, quantification dans des matrices organiques complexes et accumulation par *Daphnia magna* et *Artemia* sp.

Roxane Danquigny

## ► To cite this version:

Roxane Danquigny. Nanoplastiques modèles marqués aux isotopes stables : synthèse, quantification dans des matrices organiques complexes et accumulation par *Daphnia magna* et *Artemia* sp.. Chimie analytique. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2023. Français. NNT : 2023PAUU3080 . tel-04711945

**HAL Id: tel-04711945**

**<https://theses.hal.science/tel-04711945v1>**

Submitted on 27 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.

# THÈSE

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

Présentée et soutenue le 14 Décembre 2023  
par Roxane DANQUIGNY

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

## Nanoplastiques modèles marqués aux isotopes stables : synthèse, quantification dans des matrices organiques complexes et accumulation par *Daphnia magna* et *Artemia sp.*

### MEMBRES DU JURY

#### PRESIDENT

- Olivier DONARD

Directeur de recherche émérite CNRS / membre de l'académie des sciences, Université de Pau et des Pays de l'Adour

#### RAPPORTEURS

- Guillaume DUFLOS
- Arnaud HUVET

Directeur de recherche, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Chargé de recherche, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

#### EXAMINATEURS

- Marc METIAN

Chercheur scientifique, Agence internationale de l'énergie atomique

#### INVITE

- Séverine LE FAUCHEUR

Enseignant-chercheur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

#### DIRECTEURS

- Stéphanie REYNAUD
- Bruno GRASSL

Directrice de recherche CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour











---

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury : Guillaume Duflos, Arnaud Huvet, ainsi qu'Olivier Donard, Marc Métian et Séverine Le Faucheur d'avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Stéphanie Reynaud et Bruno Grassl, de m'avoir acceptée sans hésiter dans cette aventure et de m'avoir fait confiance pour ce sujet que j'aime tant. Bruno, Stéphanie, merci de m'avoir guidée et soutenue durant ces trois années. Merci pour votre disponibilité, votre bienveillance, et vos précieux conseils. Je suis également profondément reconnaissante pour toutes les opportunités que cette thèse m'a offertes, que ce soient les participations aux congrès ou workshop, les collaborations très enrichissantes, les échanges passionnants ou les belles rencontres, je vous les dois.

Cette thèse a été le fruit de plusieurs collaborations et j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé ou aidé à son aboutissement.

Je souhaiterais notamment remercier Marc Métian qui a cru en ce projet dès le départ. Merci Marc pour tes remarques pertinentes, ton dynamisme et ta rigueur qui m'ont beaucoup appris. Merci à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA), et particulièrement à l'équipe de radioécologie, de m'avoir accueillie pendant un mois au sein de leur laboratoire pour réaliser les expériences avec les artémias. Un grand merci à tous les membres des laboratoires de l'environnement marin pour leur accueil chaleureux, à Imma Tolosa pour son aide sur le projet, et surtout à Karin Mattsson qui a également participé activement à cette belle aventure. Merci Marc, Karin, François et Khalil pour votre aide précieuse, avant, pendant et après ce séjour, pour les nombreux échanges et pour votre patience face à mes nombreuses questions. Ce mois passé avec vous a été tellement enrichissant, et je suis très reconnaissante d'avoir eu la chance de vivre cette expérience.

J'aimerais également remercier l'Institut des Sciences Analytiques et particulier Patrick Jame, Anthony Anchisi et Erik Bonjour du pôle Isotope & Organique, qui m'ont accueillie à deux reprises pour réaliser les analyses élémentaires et isotopiques des nanoplastiques fortement enrichis. Merci pour votre enthousiasme dans le projet et pour votre aide précieuse pour les analyses. Merci à vous, ainsi qu'à Caroline et Xavier pour votre accueil chaleureux.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler au sein de l'IPREM (Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux) et tout particulièrement Séverine Le Faucheur qui a été d'une grande aide pour l'étude portant sur les daphnies. Merci Séverine pour tes conseils avisés, pour le temps que tu m'as accordé, et globalement pour ton implication dans le projet. Travailler avec toi a été un plaisir. J'aimerais aussi remercier Sophie Nolivos pour nous avoir aidé à réaliser les images en microscopie de fluorescence, merci pour ton expertise et l'intérêt que tu as porté à ces travaux. Merci à Elise Deniau qui a suivi mon travail pendant ces trois ans, lors des comités de thèse. Merci pour tes idées et réflexions enrichissantes. Merci également à Javier Jiménez-Lamana pour ton aide, lors des analyses de SP-ICP/MS et tout au long de ma thèse.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Marie Larregieu pour son aide lors des premières analyses par EA-IRMS, Virginie Pellerin pour les analyses de microscopie AFM et MEB, et Abdel Khoukh pour sa précieuse aide concernant la RMN. J'aimerais remercier tout particulièrement Brice Bouyssiere qui m'a permis de poursuivre mes développements analytiques au Py-GC/MS à l'IPREM.

---

Un grand merci à Owen Dupuy que j'ai eu la chance d'avoir encadré, merci pour ton travail rigoureux qui m'a beaucoup aidé.

J'aimerais remercier toute l'équipe Nanoplastique : Lucile, merci pour ton soutien et ton éternel optimisme ; Corentin, merci m'avoir initié à la Py-GC/MS ; Maud, merci pour l'entraide jusqu'à la fin ; Cloé, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur ; et Antoine, que je ne remercierai jamais assez.

Sophie, Hélène, je tiens à vous remercier tout particulièrement. Sophie, merci pour ton écoute, tes crêpes avant mon départ à Monaco et tes petits mots. Hélène, merci pour ton humour, tes encouragements et ta gentillesse. Merci à toutes les deux pour votre soutien, votre bienveillance et votre bonne humeur. Je n'aurais pu rêver de meilleurs compagnons de route.

J'aimerais également remercier toute la bande de la salle O203. Jordan, Audrey, Océane, Laurie, Charles, Maeva, Alex, Sébastien, et tous les autres que j'ai eu la chance de croiser, merci de m'avoir permis ces temps de respiration et de rire qui m'ont fait beaucoup de bien.

Mathilde, merci d'avoir partagé avec moi un peu du stress associé à la Py-GC/MS, mais surtout, merci pour tous les moments passés en E217 et pour ta bonne humeur communicative. Safae, merci pour toutes nos discussions, tu fais partie des belles rencontres de cette thèse. Un grand merci également à Gaëlle, Marine, Catalina et Chloé pour les discussions et moments partagés, et à Leila, merci beaucoup pour tous tes précieux conseils.

Je souhaiterais également avoir quelques mots pour des personnes qui ont joué un rôle important dans mon parcours scientifique : Merci à Alexandra ter Halle, Laura Roweczyk et Kristian Syberg qui m'ont initié au monde de la recherche et à la problématique des débris plastiques lors de mes stages de L3 et M1. Merci à Yann Aminot qui m'a conseillé pour le choix de la thèse, après m'avoir accueillie à l'Ifremer pour mon stage de M2. Et enfin, merci à Laurent Ouerdane qui m'a poussé à faire mon master à Pau. Merci pour tout ce que vous avez fait, c'est en grande partie grâce à vous que mon chemin a pris la direction qu'il a aujourd'hui.

A mes amies de longue date, Marie, Aglaé, merci de votre soutien sans faille, malgré les kilomètres qui nous séparent. A Déborah, merci d'avoir toujours été là, depuis tant d'années mais particulièrement les trois dernières, merci pour les brunchs, les virées à Emmaüs, les fleurs, les marshmallows...merci pour tout. A Claire, merci pour les discussions dans la voiture qu'on ne veut pas terminer, pour Green Day, et surtout merci d'avoir été l'une des plus belles rencontres pendant cette thèse. A Marine et Janis, merci pour votre soutien, votre écoute, et tous les moments de joie qu'on a pu vivre et qui font oublier les difficultés pendant un instant.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille pour tous leurs encouragements et pour m'avoir écouté parler longuement mon sujet de thèse. Merci pour tout.





---

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>12</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>14</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>29</b>
<b>I. Contexte</b>	<b>31</b>
I. 1. Origine de la pollution plastique	31
I. 2. Des macroplastiques aux nanoplastiques	34
I. 3. La problématique particulière des nanoplastiques	39
<b>II. Les nanoplastiques modèles</b>	<b>41</b>
II. 1. Utilisation des nanoplastiques modèles	41
II. 2. Elaboration de nanoplastiques modèles	42
<b>III. Caractérisations et quantification des nanoplastiques non marqués</b>	<b>44</b>
III. 1. Caractérisations des nanoplastiques	44
III. 2. Quantification des nanoplastiques	45
III. 3. Préconcentration, séparation et digestion	46
<b>IV. Les techniques de marquage</b>	<b>47</b>
IV. 1. Le marquage fluorescent	47
IV. 2. Le marquage aux métaux (ou métalloïdes)	48
IV. 3. Le marquage aux lanthanides ou particules luminescentes	49
IV. 4. Le marquage isotopique	50
IV. 5. Bilan	51
<b>Conclusion</b>	<b>52</b>
<b>CHAPITRE 2. SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NANOPLASTIQUES MODELES MARQUES A L'ISOTOPE 55</b>	<b>55</b>
<b>Introduction</b>	<b>57</b>
<b>I. Synthèse bibliographique : la polymérisation par émulsion</b>	<b>58</b>
I. 1. La polymérisation par émulsion avec tensioactifs	58
I. 2. La polymérisation par émulsion sans tensioactif	59
<b>II. Matériels et méthodes</b>	<b>62</b>
II. 1. Matériels	62
II. 2. Méthodes	62
<b>III. Synthèse des nanoplastiques marqués à l'isotope</b>	<b>66</b>
III. 1. Stratégie de synthèse	66
III. 2. Nanoplastiques marqués au deutérium	67

III. 3. Nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C.....	71
III. 4. Effets isotopiques.....	73
<b>IV. Caractérisation des nanoplastiques marqués.....</b>	<b>77</b>
IV. 1. Détermination de la fraction de polyacrylique par RMN.....	77
IV. 2. Titration des groupements carboxyles à la surface des nanoplastiques.....	79
IV. 3. Stabilité.....	82
<b>Conclusion.....</b>	<b>83</b>

### **CHAPITRE 3. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES NANOPLASTIQUES**

#### **MARQUES A L'ISOTOPIE 85**

<b>Introduction.....</b>	<b>87</b>
<b>I. Bibliographie.....</b>	<b>88</b>
I. 1. Py-GC/MS.....	88
I. 2. EA-IRMS.....	93
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>97</b>
II. 1. Matériels.....	97
II. 2. Méthodes.....	98
<b>III. Quantification des nanoplastiques par Py-GC/MS.....</b>	<b>99</b>
III. 1. Objectif.....	99
III. 2. Quantification les nanoplastiques seuls.....	99
III. 3. Répétabilité, et limites de détection et de quantification.....	106
III. 4. Effets de matrice.....	108
III. 5. Bilan.....	111
<b>IV. Quantification des nanoplastiques par EA-IRMS.....</b>	<b>112</b>
IV. 1. Objectif.....	112
IV. 2. Calcul de la signature isotopique d'un mélange entre deux substances A et B.....	112
IV. 3. Simulations pour des nanoplastiques seuls et mélangés à la matrice organique.....	114
IV. 4. Etude préliminaire avec NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -11%.....	118
IV. 5. Développement de la méthode finale avec NP-( <sup>13</sup> C) <sub>ε</sub> -100%.....	119
IV. 6. Bilan.....	125
<b>Conclusion.....</b>	<b>126</b>

### **CHAPITRE 4. ETUDE DE L'ACCUMULATION ET DE LA TOXICITE DES NANOPLASTIQUES CHEZ *DAPHNIA***

#### **MAGNA ET ARTEMIA SP. A L'AIDE DU MARQUAGE ISOTOPIQUE 129**

<b>Introduction.....</b>	<b>131</b>
<b>I. Bibliographie.....</b>	<b>132</b>
I. 1. Présentation des organismes d'étude.....	132
I. 2. Étude des interactions nanoplastiques - <i>Daphnia magna</i> .....	137
I. 3. Etude des interactions nanoplastiques - <i>Artemia sp.</i> .....	142
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>144</b>
II. 1. Organismes d'étude.....	144
II. 2. Nanoplastiques testés.....	144



II. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de crustacés planctoniques.....	144
II. 4. Instruments et protocoles d'analyse .....	150
<b>III. Etude n°1 : Accumulation et toxicité des nanoplastiques marqués au deutérium vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>152</b>
III. 1. Description des nanoplastiques utilisés : NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%.....	152
III. 2. Résumé du développement analytique au Py-GC/MS .....	153
III. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i> .....	154
III. 4. Bilan de l'étude .....	163
<b>IV. Etude n°2 : Accumulation des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C par <i>Artemia sp.</i>.....</b>	<b>164</b>
IV. 1. Description des nanoplastiques modèles utilisés : NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% .....	164
IV. 2. Résumé du développement analytique à l'EA-IRMS.....	166
IV. 3. Accumulation des nanoplastiques par <i>Artemia sp.</i> .....	167
IV. 4. Bilan de l'étude .....	176
<b>Conclusion.....</b>	<b>178</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>186</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>198</b>



---

## **ABREVIATIONS**

<b>A4F</b>	Fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique
<b>AA</b>	Acide acrylique
<b>AFM</b>	Microscopie à force atomique
<b>AIBN</b>	Azobisisobutyronitrile
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Alumine
<b>AMA-80</b>	Dihexyl sulfosuccinate de sodium
<b>APS</b>	Ammonium persulfate
<b>BCF</b>	Facteurs de bioconcentration
<b>BET</b>	Méthode Brunauer, Emmett et Teller
<b>BF</b>	Brightfield
<b>BPO</b>	Peroxyde de benzoyle
<b>BSA</b>	<i>Bovin Serum Albumin</i>
<b>C(=NH)-NH<sub>2</sub></b>	Groupe amidine
<b>CES</b>	Chromatographie d'exclusion stérique
<b>COOH</b>	Groupe carboxyle
<b>DF</b>	Darkfield
<b>DLS</b>	Diffusion dynamique de la lumière
<b>EA-IRMS</b>	Analyse élémentaire couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique
<b>EGA</b>	<i>Evolved Gas Analysis</i>
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>
<b>FFF</b>	Fractionnement par couplage flux-force
<b>FTIR</b>	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HC/EGA-GC/MS</b>	Désorption thermique multi-étapes
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Acide nitrique
<b>ICP-MS</b>	Spectrométrie de masse à plasma induit par couplage inductif classique
<b>ICP-OES</b>	Spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif
<b>IR</b>	Infrarouge
<b>IRMS</b>	Spectrométrie de masse à ratio isotopique
<b>KIE</b>	Effet isotopique cinétique
<b>KOH</b>	Hydroxyde de potassium
<b>LD</b>	Limite de détection
<b>LDA</b>	Analyse par diffraction laser
<b>LDI</b>	Limite de détection instrumentale
<b>LPFluo</b>	Lecteur de plaques en fluorescence
<b>LQ</b>	Limite de quantification
<b>LSC</b>	<i>Liquid scintillation counting</i>
<b>LSC</b>	Comptage à scintillation liquide
<b>MALS</b>	Détecteur de diffusion de lumière multi-angle
<b>MEB</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>MicroFluo</b>	Microscopie de fluorescence
<b>MicroOpt</b>	Microscopie optique
<b>MMA</b>	Méthacrylate de méthyle
<b>MO</b>	Matière organique
<b>MP</b>	Microplastique

---

<b>NanoSIMS</b>	<i>Nanoscale secondary ion mass spectrometry</i>
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>NH<sub>2</sub></b>	Groupement amine
<b>NP</b>	Nanoplastique
<b>NTA</b>	Analyse du suivi individuel de particules
<b>OCDE</b>	Organisation de coopération et de développement économiques
<b>OSPAR</b>	<i>Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic</i>
<b>PDI</b>	Indice de polydispersité
<b>PE</b>	Polyéthylène
<b>PE-HD</b>	Polyéthylène à haute densité
<b>PE-LD</b>	Polyéthylène à basse densité
<b>PET</b>	Polyéthylène téréphtalate
<b>PMMA</b>	Poly(méthacrylate de méthyle)
<b>PP</b>	Polypropylène
<b>PS</b>	Polystyrène
<b>PV</b>	Pyrocatechol violet
<b>PVAC</b>	Poly(acétate de vinyle)
<b>PVC</b>	Polyvinyle de chlorure
<b>Py-GC/MS</b>	Pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse
<b>QWBA</b>	<i>Quantitative Whole-Body Autoradiography</i>
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals</i>
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>S</b>	Styrène
<b>SDBS</b>	Sodium dodecyl benzenesulfonate
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>Se</b>	Styrène enrichi
<b>SERS</b>	Diffusion Raman exaltée de surface
<b>SIM</b>	<i>Single Ion Monitoring</i>
<b>SMOW</b>	<i>Standard Mean Ocean Water</i>
<b>SpectroFluo</b>	Spectrophotomètre de fluorescence
<b>SpectroRaman</b>	Spectroscopie de Raman
<b>SP-ICP-MS</b>	ICP-MS en mode comptage individuel de particules
<b>SRS</b>	Diffusion Raman stimulée
<b>TCD</b>	Détecteur de conductivité thermique
<b>TD</b>	Tube digestif
<b>TD-GC/MS</b>	Thermodésorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse
<b>TD-PTR/MS</b>	Thermodésorption couplée à la spectrométrie de masse par réaction de transfert de proton
<b>TEM</b>	Microscopie électronique en transmission
<b>Tergitol NP40</b>	Nonylphénol avec 40 unités d'éthoxylate
<b>TERS</b>	Diffusion Raman exaltée par effet de pointe
<b>TGI</b>	Time-gated Imaging
<b>TMAH</b>	Hydroxyde de tétraméthylammonium
<b>ToF</b>	Analyseur à temps de vol
<b>TSCA</b>	<i>Toxic Substance Control Act</i>
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>V-PDB</b>	Vienna Pee-Dee-Belemnite

---

## TABLE DES FIGURES

Figure 1.1: Production mondiale de plastique (comptabilisant les textiles) en millions de tonnes, entre de 1950 à 2017, avec projection jusqu'à 2050, issu de Geyer <i>et al.</i> <sup>17</sup> .....	31
Figure 1.2: Répartition de l'utilisation des plastiques à l'échelle mondiale en 2019, par domaine d'application et types de polymères. Issu de l'OCDE, 2022. <sup>16</sup> .....	32
Figure 1.3: Production mondiale de plastiques et de déchets plastiques en 2019 et leur devenir. Adapté de l'OCDE, 2022. <sup>16</sup> .....	33
Figure 1.4: Classification des particules de plastique en fonction de leur taille, définition selon Hartmann <i>et al.</i> Adapté de Mattern. <sup>31</sup> .....	34
Figure 1.5: Images MEB d'un mésoplastique <sup>29</sup> (A), de microplastiques <sup>38</sup> (B), échantillonnés dans le gyre l'océan Atlantique Nord, et de nanoplastiques produits par fragmentation mécanique de polystyrène expansé <sup>34</sup> (C) ou image TEM de nanoplastiques produits par photodégradation de microplastiques échantillonnés dans le gyre l'océan Atlantique Nord <sup>37</sup> (D) .....	36
Figure 1.6: Schéma récapitulatif des transformations et caractéristiques des débris plastiques dans l'environnement jusqu'à l'échelle nanométrique. Adapté de Gigault <i>et al.</i> 2021 <sup>10</sup> .....	39
Figure 1.7: Différentes voies d'exposition des micro- et nanoplastiques pour les animaux de type monogastrique, et limites de taille pour la translocation des débris plastiques. Issu de Dong <i>et al.</i> <sup>9</sup> .....	40
Figure 1.8: Origine des modèles utilisés dans la littérature : NP commerciaux (noir) et non commerciaux (bleu) de 2012 jusqu'à 2021. Issu de Aynard, 2022. <sup>85</sup> .....	41
Figure 1.9: Schéma récapitulatif des méthodes par voie descendante ( <i>top-down</i> ) et voie ascendante ( <i>bottom-up</i> ) pour l'élaboration de nanoplastiques modèles. Adapté de Reynaud <i>et al.</i> , 2022 <sup>12</sup> et Aynard, 2022. <sup>85</sup> .....	42
Figure 1.10: Représentation schématique des propriétés essentielles des nanoplastiques à caractériser .....	44
Figure 2.1: Principe général de la polymérisation en émulsion avec tensioactifs, avec en jaune le monomère hydrophobe (styrène), en bleu les tensioactifs, et sous forme d'étoile l'amorceur hydrosoluble. A : Premiers instants, B : Début de la polymérisation, C : Croissance des particules, D : fin de la réaction de polymérisation à conversion totale.....	58
Figure 2.2: Principe général de la polymérisation en émulsion sans tensioactif, avec en jaune le monomère hydrophobe (styrène), en bleu le comonomère hydrosoluble et sous forme d'étoile, l'amorceur hydrosoluble. A : Premiers instants, B : Début de la polymérisation, C : Croissance des particules, D : fin de la réaction de polymérisation à conversion totale.....	59
Figure 2.3: Exemple de mécanisme réactionnel de la polymérisation radicalaire dans le cas de la copolymérisation de styrène et d'acide acrylique avec les différentes étapes : amorçage sur l'acide acrylique (A), propagation sur le styrène (B) et terminaison entre deux oligomères de polystyrène par combinaison (C) ou dismutation (D).....	60
Figure 2.4: Evolution de la structure des particules en fonction de la conversion ( $\chi$ ) observée par AFM avec une barre d'échelle de 100 nm. Issu de Aynard, 2022. <sup>85</sup> .....	61

Figure 2.5 Evolution de la fraction de polyacrylique en fonction de la conversion ( $\chi$ ) en polymère d'un échantillon de type NP <sup>12</sup> C avec 18% d'acide acrylique. Résultats obtenus par suivi FTIR (A) et par RMN (B), issu de Aynard, 2022. <sup>85</sup> .....	61
Figure 2.6: Schéma présentant la stratégie de synthèse .....	66
Figure 2.7: Images AFM des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> , en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm.....	69
Figure 2.8: Images AFM des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> , en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm.....	71
Figure 2.9: Images AFM des nanoplastiques marqués carbone <sup>13</sup> C à l'aide du styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> ou du styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> , en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm. ....	72
Figure 2.10: Spectre RMN 1H des nanoplastiques non marqués (vert) et du styrène non marqué (noir).....	77
Figure 2.11: Spectre RMN des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C, NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% (rouge) et du styrène non marqué (noir). ....	78
Figure 2.12: Principe général de la méthode de titration colorimétrique de groupements carboxyles situées à la surface de nanoplastiques proposée par Henning <i>et al.</i> Adapté de Henning <i>et al.</i> <sup>159</sup> .	79
Figure 2.13: Analyse en spectroscopie UV-visible du complexe pyrocatechol violet-Ni <sup>2+</sup> en fonction de la concentration de Ni <sup>2+</sup> (entre 0, en vert, et 100 μmol.L <sup>-1</sup> , en bleu) pour C <sub>pv</sub> = 40 μmol.L <sup>-1</sup> , avec en A, les spectres d'absorption et en B, la variation de l'absorbance à 614 nm corrigée (A <sub>614</sub> - A <sub>800</sub> ) en fonction de la concentration de Ni <sup>2+</sup> . (---) régression linéaire avec R <sup>2</sup> = 0,989. ....	80
Figure 2.14: Absorbance du pyrocatechol violet corrigée (A <sub>614</sub> - A <sub>800</sub> ) en fonction du volume de dispersion de nanoplastiques, pour une quantité constante d'ions Ni <sup>2+</sup> (C <sub>Ni2+</sub> = 200 μmol.L <sup>-1</sup> ). Régression linéaire pour V <sub>NP</sub> < V <sub>eq</sub> (---) de la forme A <sub>614 corr</sub> = a*V <sub>NP</sub> + b, A <sub>PV</sub> (—).....	80
Figure 2.15: Image MEB des NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100% et NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%. Barre d'échelle à 100 nm.....	81
Figure 3.1: Schéma d'un pyrolyseur couplé à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Py-GC/MS). Adapté de Tsuge <i>et al.</i> <sup>172</sup> .....	88
Figure 3.2: Exemple de thermogramme obtenu par analyse en mode <i>Evolved Gas Analysis</i> (A) et exemples de pyrogrammes obtenus à la suite d'analyses Py-GC/MS en mode <i>Single-shot</i> (B), <i>Double-shot</i> (C), <i>Heart-cutting</i> (D). Adapté des informations techniques fournies par Frontier Lab. <sup>173</sup> .....	89
Figure 3.3: Schéma des différents types de pyrolyseurs actuellement sur le marché : pyrolyseur à point Curie (A), pyrolyseur à filament (B) et pyrolyseur à four thermique (C). Adapté de Picó et Braceló. <sup>174</sup> .....	91
Figure 3.4: Schéma d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (EA-IRMS), dans le cas de l'analyse du carbone. Adapté de Ogawa <i>et al.</i> <sup>185</sup> .....	94
Figure 3.5: Pyrogramme des nanoplastiques non marqués NP <sub>nat</sub> (en courant ionique total, TIC), réalisé à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B). Notations des fragments détaillées en Annexe 3. ....	100
Figure 3.6: Spectres de masse en intensité relative du styrène de la base de donnée NIST (A, noir) ou du pic du styrène (au temps de rétention de 4,5 min) obtenu par l'analyse des nanoplastiques non marqués NP <sub>nat</sub> (B, gris) ou marqués : NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -100% (C, violet), NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% (D, rouge), NP-	

(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (E, bleu) et NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (F, orange). 1,5 µg de nanoplastiques analysés, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN. .... 101

Figure 3.7: Fraction du fragment styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> de masse m/z=112, en pourcentage par rapport au styrène de masse m/z=104, en fonction de la température de pyrolyse (A), de la masse de nanoplastiques analysés, à 500°C et *split* 1:50 (B), à 700°C et *split* 1:100 (C), à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B). .... 104

Figure 3.8: Calibrations pour NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (A-bleu), NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (B-rouge), NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (C-orange), avec suivi des fragments de styrène marqué majoritaire de masse m/z=109, 110 et 112, respectivement. Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Shimadzu (GCMS-QP2010 SE), en mode SIM, en triplicat pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% et en duplicat pour les NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100%. .... 105

Figure 3.9: Variation relative de l'intensité du fragment m/z=109 produit par la pyrolyse de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (n=3 réplicats), en fonction du temps et de la masse de nanoplastiques analysée : 0,024 µg (bleu clair) et 1,5 µg (bleu foncé). .... 106

Figure 3.10: A gauche : Aire du fragment m/z=109 produit après pyrolyse de 1,5 µg de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%, en fonction de la masse de NaCl ajoutée avec l'échantillon. A droite : Calibrations de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% préparés dans de l'eau MilliQ (gris), ou dans l'eau douce de référence (bleu), et analysés en suivant le fragment de masse m/z=109. Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN. .... 108

Figure 3.11: Pyrogrammes des matrices organiques modèles : acide humique (A), alginate (B), et albumine de sérum bovin ou BSA (C), avec suivi des masses m/z=104 (vert), 109 (bleu), 110 (rouge) et 112 (orange). Les analyses ont été réalisées pour 30 µg de matrices organiques modèles, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN. .... 109

Figure 3.12: A gauche : Pyrogrammes des matrices sans nanoplastiques : *Daphnia magna* (A), *Artemia sp.* (C), et *Mytilus edulis* (E), avec suivi des masses m/z=104 (vert), 109 (bleu), 110 (rouge) et 112 (orange). A droite : Calibrations de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% avec matrice (bleu) et sans matrice (gris), pour les matrices : *Daphnia magna* (B), *Artemia sp.* (D), et *Mytilus edulis* (F), en suivant la masse m/z=109. Les analyses avec matrice ont été faites avec les quantités suivantes : 20 organismes séchés pour *Daphnia magna* (A-B), et 150 µg de matrice lyophilisée et broyée pour *Artemia sp.* (C-D), et *Mytilus edulis* (E-F). Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN (A-B-C-D) ou SIM (E-F). .... 110

Figure 3.13 : Composition des nanoplastiques marqués : Styrène (S), Styrène enrichi (Se) et Acide acrylique (Ac), avec  $x_s$ ,  $x_{Se}$  et  $x_{Ac}$  leurs fractions molaires respectives et  $xS' + xSe' + xAc = 1$ . .... 114

Figure 3.14: Simulation du  $\delta^{13}C$  d'un mélange de nanoplastiques NP-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (violet, pour  $\delta(^2H)_{NP} = 1,1.10^8 \text{‰}$ ), NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (bleu, pour  $\delta(^2H)_{NP} = 9,3.10^5 \text{‰}$ ), NP-(<sup>2</sup>H)<sub>1</sub>-11% (vert, pour  $\delta(^2H)_{NP} = 8,4.10^4 \text{‰}$ ), NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (rouge, pour  $\delta(^{13}C)_{NP} = 2,4.10^5 \text{‰}$ ), NP-(<sup>13</sup>C)<sub>1</sub>-11% (orange, pour  $\delta(^{13}C)_{NP} = 1,2.10^4 \text{‰}$ ), ou NP<sub>nat</sub> (gris, pour  $\delta(^{13}C)_{NP} = -29 \text{‰}$ ), en fonction de la fraction massique  $w_{NP}$ . Avec  $\delta(^{13}C)_{MO} = -15 \text{‰}$  et  $\delta(^2H)_{MO} = -13 \text{‰}$ . .... 117

Figure 3.15:  $\delta^{13}C$  d'un mélange de nanoplastiques et de matière organique (en vert, A : acide humique et B : alginate) en fonction de la fraction massique en nanoplastiques non marqués (gris : NP<sub>nat</sub>) ou marqués au carbone <sup>13</sup>C (orange : NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-11%). Les lignes et les ronds pleins correspondent aux  $\delta^{13}C$  expérimentaux des substances seules et des mélanges respectivement, et les ronds vides correspondent aux  $\delta^{13}C$  théoriques des mélanges. .... 118

Figure 3.16: Signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%) et non marqués (NP-nat), sous la forme de <b>1x13Ctot – x13CNPnat</b> , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme <b>1wNPe</b> ou de <b>wNPe</b> . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides sont les données ayant saturé l'EA-IRMS.....	121
Figure 3.17: Variation de la signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%) et de matière organique modèle (A: acide humique et B: alginate), sous la forme de <b>1x13Ctot – x13CMO</b> , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme <b>1wNP</b> ou de <b>wNP</b> . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides n'ont pas été pris en comptes pour la régression linéaire.....	123
Figure 3.18: Signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%) et d' <i>Artemia sp.</i> , sous la forme de <b>1x13Ctot – x13CMO</b> , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme <b>1wNP</b> ou de <b>wNP</b> . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides n'ont pas été pris en comptes pour la régression linéaire. ....	123
Figure 4.1: Schéma anatomique d'une <i>Daphnia sp.</i> femelle adulte. Adapté de Ebert, 2005 <sup>201</sup> .....	132
Figure 4.2: Schéma du système de reproduction de <i>Daphnia sp.</i> Adapté de Ebert, 2005 <sup>201</sup> et Turk, 2011 <sup>203</sup> .....	133
Figure 4.3: Courbe de distribution de la sensibilité des espèces à des nanoparticules d'argent. <i>Daphnia magna</i> est décrit comme l'espèce la plus sensible. Repris de Liu <i>et al.</i> <sup>204</sup> .....	134
Figure 4.4: Schéma anatomique de <i>Artemia franciscana</i> adultes avec différenciation entre mâles (à gauche) et femelles (à droite). Adapté de Dockery et Tomkins, 2000 <sup>214</sup> .....	136
Figure 4.5: Image MEB (A) et images AFM des NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%, en hauteur (C) et en adhésion (C). Barre d'échelle à 100 nm.....	152
Figure 4.6: Suivi de la taille (● - axe à gauche) et polydispersité (○ - axe à droite) des nanoplastiques deutérés pendant 7 jours pour une concentration de 50 ppm dans l'eau douce de référence (norme ISO 634). Mesures effectuées à température ambiante.....	153
Figure 4.7: Schéma présentant la stratégie de l'étude n°1. ....	154
Figure 4.8: Concentrations des milieux d'exposition mesurées par Py-GC/MS (C <sub>1</sub> et C <sub>2</sub> : échelle de gauche ; C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> : échelle de droite) en fonction du temps de prélèvement (0 ou 48 h après le début de l'exposition), pour les milieux en absence (bleu clair) pour C <sub>3</sub> et C <sub>5</sub> seulement, ou en présence des daphnies (bleu foncé). Avec : C <sub>1</sub> = 0,030 ppm ; C <sub>2</sub> = 0,38 ppm ; C <sub>3</sub> = 4,9 ppm ; C <sub>4</sub> = 12 ppm et C <sub>5</sub> = 36 ppm. ....	155
Figure 4.9: Masse de nanoplastiques deutérés accumulés par les daphnies (en ng par daphnie) après 48 h d'exposition, en fonction de la concentration moyenne en NP dans le milieu d'exposition (d'eau douce de référence, norme ISO 6341), et en fonction des conditions de dépuración : (●) pas de dépuración, (●) dépuración en milieu sans NP et sans algues, (○) dépuración en milieu sans NP avec algues. Ajustement selon le modèle de Michaelis-Menten, décrit par l'équation 4.1, pour chaque condition de dépuración (---).....	157
Figure 4.10: Images de microscopie optique en mode darkfield et brightfield (DF et BF, échelle = 200 μm), et leur zoom (DF-zoom et BF-zoom, échelle = 100 μm) de <i>Daphnia magna</i> après 24 h	



d'exposition à 0 ppm (Témoin- A) ou 36 ppm de NP-(2H)5-100% (B - D) ou selon les conditions de dépuración suivantes : pas de dépuración (B), dépuración sans algues (C), dépuración avec algues (A et D). Images complémentaires en Annexe 4. ....	159
Figure 4.11: Image MEB (A) et images AFM des NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% en hauteur (C) et en adhésion (C). Barre d'échelle à 100 nm. ....	164
Figure 4.12: Suivi par DLS de la taille (● - axe à gauche) et de la polydispersité (○ - axe à droite) des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C pendant 7 jours pour une concentration de 50 ppm dans l'eau de mer. Mesures effectuées à température ambiante. ....	165
Figure 4.13: Schéma présentant la stratégie de l'étude n°2. ....	167
Figure 4.14: Concentration des milieux d'exposition des artémias, mesurées par Py-GC/MS (C <sub>7</sub> de la série 3 et C <sub>4</sub> de la série 2 : échelle de gauche ; C <sub>5</sub> et C <sub>6</sub> : échelle de droite), en fonction du temps de prélèvement (0, 24 h ou 48 h après le début de l'exposition), pour les milieux en absence (rouge clair) ou en présence d'artémias (rouge foncé). Avec : C <sub>4</sub> = 0,4 ppm, C <sub>5</sub> = 3 ppm, C <sub>6</sub> = 7 ppm et C <sub>7</sub> = 0,7 ppm. ....	168
Figure 4.15: Mortalité des artémias exposées aux nanoplastiques pendant 24 h en fonction de la concentration d'exposition nominale. ....	170
Figure 4.16: Masse de nanoplastiques accumulée après 24 h d'exposition, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), en fonction de la concentration d'exposition, et en fonction de la méthode d'analyse : Py-GC/MS (bleu) ou EA-IRMS (rouge), en représentation log-log (A) ou linéaire (B). Limite de détection (—), limite de quantification (---) et régression linéaire (----). ....	171
Figure 4.17: Masse de nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), quantifiés par EA-IRMS, en fonction du temps d'exposition et de la concentration d'exposition : 0,4 ppm (bleu), 3,0 ppm (rouge) et 7 ppm (noir). Modèle de type exponentiel avec saturation (---) décrit par l'équation 4.3. ....	173
Figure 4.18: Masse de nanoplastiques, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), quantifiés par EA-IRMS, en fonction du temps d'exposition (concentration d'exposition à 0,47 ppm). Modèle de type exponentiel avec saturation (---) décrit par l'équation 4.3. ....	173
Figure 4.19: Cinétique de dépuración des nanoplastiques exposés 24 h à 0,4 ppm puis transférés dans de l'eau de mer non contaminée : Masse résiduelle de nanoplastiques dans les artémias (en pourcentage) en fonction du temps de dépuración. Modèle de type exponentiel à double composante (---) décrit par l'équation 4.4. ....	174
Figure 4.20: Masse de nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C accumulés par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), en fonction du genre des organismes : mâles (bleu) ou femelles (rouge) et de la concentration d'exposition (1,6 ; 4,0 et 4,5 ppm), normalisée par rapport à la quantité mesurée dans les femelles. Quantification par EA-IRMS, avec n=4 réplicats. ....	176



---

## **TABLE DES TABLEAUX**

Tableau 1.1: Récapitulatif des concentrations en nanoplastiques mesurées en milieu aquatique. <sup>67</sup> .....	38
Tableau 2.1: Noms, formules chimiques, masses molaires (M) en g/mol et masses volumiques (g/mL) des monomères utilisés. ....	67
Tableau 2.2: Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques synthétisés à partir du styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> . ....	69
Tableau 2.3: Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> . ....	70
Tableau 2.4: Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C à l'aide du styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> ou du styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> . ....	72
Tableau 2.5: Analyse par Py-GC/MS des nanoplastiques deutérés : proportion de l'aire du fragment marqué, (styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> de masse m/z=112 pour les NP-( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> , et styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> de masse m/z=109 pour les NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> ), et le fragment non marqué de masse m/z=104, en pourcentage.....	74
Tableau 2.6: Proportion de polyacrylique calculée par RMN pour les NP <sub>Nat</sub> et les NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% . 78	
Tableau 2.7: Concentrations des groupements carboxyles des NP <sub>Nat</sub> , NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100% et NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%, en μmol/g et nombre de groupement par nm <sup>2</sup> . ....	81
Tableau 3.1: Intensités relatives (en pourcentage) des fragments de masses comprises entre 101 et 114, calculées à partir des aires des pics, par rapport à l'aire la plus intense. 1,5 μg de nanoplastiques analysés, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN. ....	102
Tableau 3.2: Intensité relative des fragments de styrène (en pourcentage, par rapport à l'aire la plus intense) en fonction de la masse de nanoplastiques analysée pour les NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100% (A, avec m/z compris entre 104 et 111), les NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% (B, avec m/z compris entre 106 et 111) et les NP <sub>TA</sub> -( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> -100% (C, avec m/z compris entre 107 et 114). Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN. ....	105
Tableau 3.3: Signatures isotopiques théoriques de nanoplastiques. ....	116
Tableau 3.4: Valeurs expérimentales de $\alpha(^{13}\text{C})$ et $\delta(^{13}\text{C})$ obtenues pour les matières organiques modèles (acide humique et alginate) et les nanoplastiques (NP <sub>Nat</sub> et NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -11%), et leur comparaison avec les valeurs théoriques calculées.....	118
Tableau 3.5: Signatures isotopiques et pourcentages de carbone des NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% et des matières organiques.....	122
Tableau 3.6: Limites de détection et de quantification pour les différentes matrices et les différents nanoplastiques utilisés. ....	124
Tableau 4.1: Synthèse bibliographique de l'étude de l'accumulation des NP chez <i>D. magna</i> .....	140
Tableau 4.2: Synthèse bibliographique de l'étude de l'accumulation des NP chez <i>Artemia sp.</i> .....	143
Tableau 4.3: Résumé des conditions expérimentales des différentes séries l'étude n°2. ....	147
Tableau 4.4: Propriétés des nanoplastiques NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%. ....	152
Tableau 4.5: Concentrations moyennes d'exposition des daphnies. ....	156

---

Tableau 4.6: Nombre d'individus immobilisés en pourcentage.....	156
Tableau 4.7: Bilan de masse des nanoplastiques par puits : différence de masse de nanoplastiques dans le milieu d'exposition entre $t_0$ et $t_{48}$ (en $\mu\text{g}/\text{puits}$ ), masse de nanoplastiques accumulés par les daphnies avant dépuración (en $\mu\text{g}/\text{puits}$ ) et pourcentage des nanoplastiques accumulés par rapport à la différence de masse de nanoplastiques totale.....	161
Tableau 4.8: Masse de nanoplastiques deutérés quantifiés par Py-GC/MS (en ng par daphnie, résultats en mg/g en Annexe 11) pour les différentes conditions de dépuración, pourcentage de diminution après dépuración et facteur de bioconcentration (BCF) correspondant, en fonction de la concentration moyenne du milieu d'exposition, pour la condition sans dépuración.....	162
Tableau 4.9: Propriétés des nanoplastiques NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% .....	164
Tableau 4.10: Concentrations moyennes d'exposition des artémias. ....	169
Tableau 4.11: Masse de nanoplastiques accumulée après 24 h d'exposition, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), et facteur de bioconcentration (BCF) en fonction de la concentration d'exposition et de la méthode d'analyse : Py-GC/MS ou EA-IRMS.....	172
Tableau 4.12: Paramètres des cinétiques d'accumulation, estimés avec un modèle de type exponentiel avec saturation, décrit par l'équation 4.3. ....	174
Tableau 4.13: Paramètres des cinétiques d'accumulation, estimés avec un modèle de type exponentiel à double composant, décrit par l'équation 4.4, et temps de demi-vie des deux composants déterminés par l'équation 4.5. ....	175





## INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'essor des matériaux plastiques dans les années 50, leur production n'a cessé d'augmenter, atteignant 460 millions de tonnes de plastiques à l'échelle mondiale pour l'année 2019, soit près du double de la quantité produite pendant l'année 2000.<sup>1</sup> Une consommation de cette ampleur génère d'énormes quantités de déchets plastiques dont la majorité est ensevelie en décharge ou rejetée directement dans l'environnement, notamment en raison de la difficulté que représente le recyclage des matériaux plastiques. Ainsi, plus de 5300 millions de tonnes de déchets plastiques auraient été enfouies ou jetées dans l'environnement entre 1950 et 2017.<sup>1</sup>

Une fois dans l'environnement, sous l'effet des rayons du soleil,<sup>2</sup> de l'action des vagues<sup>3</sup> ou de microorganismes,<sup>4</sup> les déchets plastiques se dégradent en particules micro- et nanoplastiques (NP). Ces petits débris plastiques ont été retrouvés dans différents milieux, y compris dans des zones éloignées supposément exempts de plastiques, telles que les pôles,<sup>5,6</sup> ou les sommets des montagnes,<sup>7,8</sup> ce qui met en évidence une ubiquité probable, en particulier pour les plus petits débris. De plus, du fait de leur taille, les nanoplastiques peuvent potentiellement traverser certaines barrières biologiques et induire de la toxicité,<sup>9</sup> par leur seule présence, ou en transportant d'autres contaminants (effet « Cheval de Troie ») tels que des composés chimiques toxiques, des polluants ou des microorganismes pathogènes. Les contaminants transportés peuvent provenir du plastique lui-même (additifs) ou peuvent avoir été adsorbés durant la vie des débris *via* leur surface spécifique très élevée et du fait de leur nature (hydrophobicité du polymère et surface oxydée).<sup>10</sup> Cette potentielle toxicité associée avec la probable ubiquité des nanoplastiques suscite des préoccupations quant à leurs impacts potentiels sur les écosystèmes et la santé humaine.

Ainsi, il existe un réel besoin de compréhension du comportement (devenir et impact) des nanoplastiques dans l'environnement, et en particulier des interactions nanoplastiques-organismes, comprenant notamment les phénomènes d'accumulation des nanoplastiques dans les organismes, leur translocation dans les tissus et leur toxicité. Cependant, l'échantillonnage et la quantification des nanoplastiques dans les matrices environnementales restent encore des défis majeurs en raison de leur faible concentration (à l'échelle de l'ultratrace), de leur nature et de leur taille.<sup>11</sup> Des nanoplastiques modèles, commerciaux ou élaborés en laboratoire, sont donc utilisés à la place des débris plastiques naturels pour réaliser des études en laboratoire, visant à simuler et imiter le comportement des nanoplastiques dans l'environnement. Les nanoplastiques commerciaux ont l'avantage d'être faciles d'accès, mais leur composition n'est souvent pas détaillée et ils peuvent contenir des additifs, notamment des tensioactifs et/ou des conservateurs, modifiant les propriétés physico-chimiques et la toxicité de l'échantillon. Au contraire, l'élaboration de nanoplastiques modèles en laboratoire permet d'avoir un contrôle des propriétés des particules (formes, tailles, fonctionnalités de surface) et leurs compositions chimiques.<sup>12</sup>

Pour quantifier les nanoplastiques non marqués, il existe des techniques permettant d'obtenir des concentrations en masse *via* des techniques thermoanalytiques, comme la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (Py-GC/MS) ou des concentrations en nombre, *via* des techniques de diffusion de la lumière comme l'analyse du suivi individuel de particules (NTA, de l'anglais *Nanoparticle Tracking Analysis*)<sup>11</sup> ou des techniques de spectroscopie, généralement couplée à la microscopie, comme la diffusion Raman exaltée par effet de *pointe* (TERS de l'anglais *Tip-enhanced Raman spectroscopy*).<sup>13</sup> Cependant, dès lors que la matrice est trop complexe, les échantillons doivent subir de nombreuses étapes de préparation, pour séparer les débris plastiques et les purifier de potentiels interférents, étapes qui peuvent, dans le cas des

nanoplastiques, engendrer un taux de récupération bas et non répétable, ou une dégradation des particules, et ainsi fausser les résultats de quantification.<sup>11</sup>

Pour remédier à cette problématique, de nombreuses études sur le comportement des nanoplastiques sont réalisées avec des nanoplastiques modèles marqués. Il existe différentes techniques de marquage (métallique, fluorescent, isotopique, etc.) ayant pour but de faciliter le suivi et la quantification des nanoplastiques, aux concentrations (en nombre ou en masse) les plus basses possibles, tout en minimisant les interférences avec les matrices environnementales. Cependant, pour donner des résultats fiables, les marqueurs, liés ou non par covalence aux nanoplastiques ne doivent pas se désorber, ni modifier les propriétés des nanoplastiques (densité, chimie de surface, stabilité, toxicité, etc.). Parmi ces différentes possibilités, le marquage covalent à l'aide d'isotopes stables permet de s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, que ce soit en termes de nature du polymère, de propriétés physico-chimiques ou de toxicité, sans risque de désorption du marqueur comme pour d'autres types de marquages.<sup>14</sup> De plus, les polymères marqués aux isotopes stables sont accessibles via leurs monomères correspondants ou leurs précurseurs facilement disponibles et manipulables, contrairement à leurs homologues radioactifs qui sont soumis à des réglementations restrictives. Par ailleurs, ce type de marquage ouvre à des techniques spécifiques aux isotopes stables comme l'analyse élémentaire couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique (EA-IRMS), technique que l'on retrouve dans de nombreux laboratoires.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse était tout d'abord d'élaborer des nanoplastiques marqués avec des isotopes stables, puis de développer les méthodes analytiques permettant leur quantification en présence de matrices complexes, afin d'étudier leur accumulation et leur toxicité vis-à-vis de deux crustacés planctoniques.

Le **Chapitre 1** fait un état des lieux, au travers d'une revue bibliographique, de la problématique des nanoplastiques, les risques qu'ils représentent pour les organismes vivants, les difficultés à les quantifier dans des matrices complexes et l'intérêt d'utiliser des nanoplastiques modèles marqués pour réaliser des études en laboratoire.

Le **Chapitre 2** décrit la synthèse des nanoplastiques modèles marqués au deutérium ou au carbone <sup>13</sup>C, par une méthode de polymérisation en émulsion sans tensioactif, et la caractérisation de leurs principales propriétés physico-chimiques.

Le **Chapitre 3** présente le développement analytique de deux méthodes de quantification en masse des nanoplastiques marqués à l'isotopie. La première méthode a été réalisée par Py-GC/MS : une méthode thermoanalytique couramment utilisée pour quantifier les micro-et nanoplastiques non marqués. La deuxième méthode a quant à elle été développée avec de l'analyse élémentaire couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique (EA-IRMS), approche innovante, qui s'inspire de la méthode quantitative de dosage d'éléments ou d'espèces dans un échantillon par dilution isotopique.

Dans le **Chapitre 4**, les nanoplastiques marqués à l'isotopie et les méthodes de quantification associées ont été utilisés pour deux études écotoxicologiques. Dans la première étude, l'accumulation et la toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de *Daphnia magna* ont été étudiées grâce à la quantification des nanoplastiques marqués au deutérium par Py-GC/MS. Dans la deuxième



étude, les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  accumulés par *Artemia sp.* ont été suivis par EA-IRMS et Py-GC/MS.

Cette thèse a été financée par une allocation de recherche PhD d'excellence 2020 de E2S UPPA et a été réalisée dans le laboratoire IPREM (Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux) de Pau, UMR 5254. Elle a fait l'objet de plusieurs collaborations, au sein de l'IPREM en impliquant des chercheurs des trois pôles scientifiques (PCM, CAPT et CME) pour aborder les volets chimie des polymères, chimie analytique et écotoxicologie (étude avec *Daphnia magna*). Deux collaborations ont aussi été mises en place hors IPREM : avec les laboratoires de l'environnement marin de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) de Monaco, notamment pour les études avec *Artemia sp.*, et avec l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Villeurbanne pour les analyses élémentaires et isotopiques.





---

## CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Contexte</b> .....	<b>31</b>
I. 1. Origine de la pollution plastique .....	31
I. 2. Des macroplastiques aux nanoplastiques .....	34
I. 3. La problématique particulière des nanoplastiques .....	39
<b>II. Les nanoplastiques modèles</b> .....	<b>41</b>
II. 1. Utilisation des nanoplastiques modèles .....	41
II. 2. Elaboration de nanoplastiques modèles .....	42
<b>III. Caractérisations et quantification des nanoplastiques non marqués</b> .....	<b>44</b>
III. 1. Caractérisations des nanoplastiques .....	44
III. 2. Quantification des nanoplastiques .....	45
III. 3. Préconcentration, séparation et digestion .....	46
<b>IV. Les techniques de marquage</b> .....	<b>47</b>
IV. 1. Le marquage fluorescent .....	47
IV. 2. Le marquage aux métaux (ou métalloïdes) .....	48
IV. 3. Le marquage aux lanthanides ou particules luminescentes .....	49
IV. 4. Le marquage isotopique .....	50
IV. 5. Bilan .....	51
<b>Conclusion</b> .....	<b>52</b>

## I. Contexte

### I. 1. Origine de la pollution plastique

#### I. 1. 1. Les matériaux plastiques : historique, production et usage

Les premiers plastiques ont vu le jour à la fin du XIXe siècle, sous la forme de celluloïd, un thermoplastique réalisé à partir de fibres de cellulose, produit à grande échelle à partir de 1872. Le premier plastique thermodurcissable a lui été créé en 1907 sous le nom de Bakelite.<sup>15</sup> Le polyvinyle de chlorure (PVC) a été inventé en 1912, mais son essor n'a commencé qu'à partir de 1927, lors de la découverte des plastifiants. Pendant la seconde guerre mondiale, la production de plastique s'est intensifiée avec l'arrivée du polyéthylène (PE), du polystyrène (PS), du polyéthylène téréphtalate (PET), ou du polyester. Après la guerre, à partir des années 50, la production de plastique n'a cessé d'augmenter (cf. Figure 1.1), et ces vingt dernières années, la production mondiale annuelle a doublé passant de 234 millions en 2000 à 460 millions de tonnes de plastiques en 2019.<sup>1,16</sup>

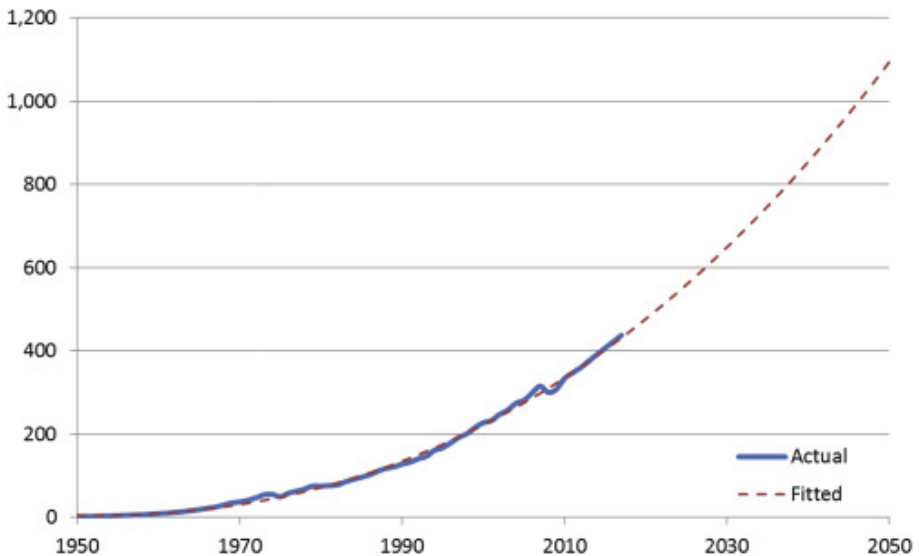
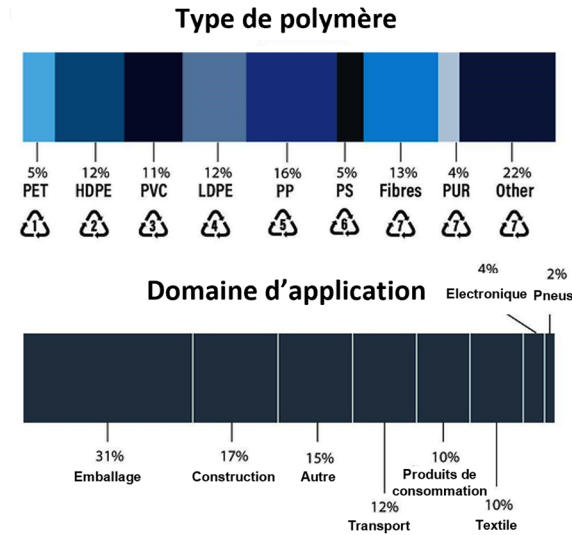


Figure 1.1: Production mondiale de plastique (comptabilisant les textiles) en millions de tonnes, entre de 1950 à 2017, avec projection jusqu'à 2050, issu de Geyer *et al.*<sup>17</sup>

En termes de types de polymères, la production est dominée par six polymères appelés les « Big six » (cf. Figure 1.2) : le polypropylène (PP, utilisé *p. ex.* pour les emballages alimentaires), le polyéthylène à basse densité (PE-LD, utilisé *p. ex.* pour les sacs plastiques), le polyéthylène à haute densité (PE-HD, utilisé *p. ex.* pour les bouteilles de shampoing), le polyvinyle de chlorure (PVC, utilisé *p. ex.* pour des cadres de fenêtre) et le polyéthylène téréphtalate (PET, utilisé *p. ex.* pour les bouteilles d'eau minérale), et le polystyrène (PS, utilisé *p. ex.* pour des isolants de construction ou pour certains pots de yaourt).<sup>16</sup>



**Figure 1.2:** Répartition de l'utilisation des plastiques à l'échelle mondiale en 2019, par domaine d'application et types de polymères. Issu de l'OCDE, 2022.<sup>16</sup>

La Figure 1.2 nous renseigne également sur les domaines d'application qui utilisent des matériaux plastiques : la majorité des plastiques sont destinés aux emballages, domaine qui représentait, en 2019, plus d'un tiers de la production mondiale, suivi par le domaine de la construction (17%) et du transport (12%). Le textile représente quant à lui 10% de la production de plastique.

### 1. 1. 2. La problématique des déchets plastiques

En mettant en relation la durée d'utilisation moyenne du plastique en fonction des différents domaines d'application, on estime que plus de deux-tiers des déchets produits proviennent de plastiques ayant moins de 5 ans d'utilisation.<sup>1</sup> Une grande partie des plastiques finit donc très rapidement par devenir des déchets. En 2019, 353 millions de tonnes de déchets plastiques ont été produits, soit l'équivalent de plus des trois quarts de la quantité de plastique produite la même année (cf. Figure 1.3).<sup>16</sup> Ainsi, en plus de contribuer au réchauffement climatique,<sup>18</sup> la surconsommation de plastique engendre un problème global de gestion des déchets, en partie dû à la difficulté à les recycler. Sur les 353 millions de tonnes de déchets plastiques produits en 2019, seuls 9% ont été recyclés, ce recyclage étant à nuancer car il est généralement en boucle ouverte, c'est-à-dire que le matériau recyclé est différent du matériau original (par exemple le recyclage d'une bouteille PET en fibre polaire, on parle alors de décyclage). Une partie des déchets non recyclés sont incinérés (25%). Mais la majorité (73%) est, soit enfouie (49% en 2019), soit jetée directement dans l'environnement (23%).<sup>16</sup> Cette fraction (mise en décharge + fuite dans l'environnement) représentait selon les estimations 256 millions de tonnes de plastiques pour l'année 2019, et s'élèverait à plus de 5300 millions de tonnes au total entre 1950 et 2017.<sup>16,17</sup> Au travers d'une simulation basée sur l'évolution observée jusqu'à présent, Geyer *et al.* ont estimé que la quantité de plastiques enfouie ou jetées directement dans l'environnement pourrait atteindre les 12 000 millions de tonnes cumulées en 2050.<sup>1,19</sup>

Une fois rejetés dans l'environnement, en raison de leur faible densité, et donc de leur propension à flotter pour la plupart, les déchets plastiques vont être transportés dans l'environnement majoritairement par les réseaux hydrographiques. Il existe donc une forte probabilité qu'une partie des déchets plastiques atteignent les océans, à partir desquels ils peuvent être transportés autour du globe (comme en témoigne le déplacement de débris plastiques depuis le Japon jusqu'en Alaska lors du tsunami de 2011<sup>20</sup>), ou au contraire être concentrés, en raison des courants marins, dans des zones d'accumulations, appelés gyres océaniques. Il existe cinq gyres situés dans l'océan Pacifique Nord et Sud, dans l'océan Atlantique Nord et Sud, et dans l'océan Indien, et l'ensemble consiste ce qu'on appelle le « septième continent ».

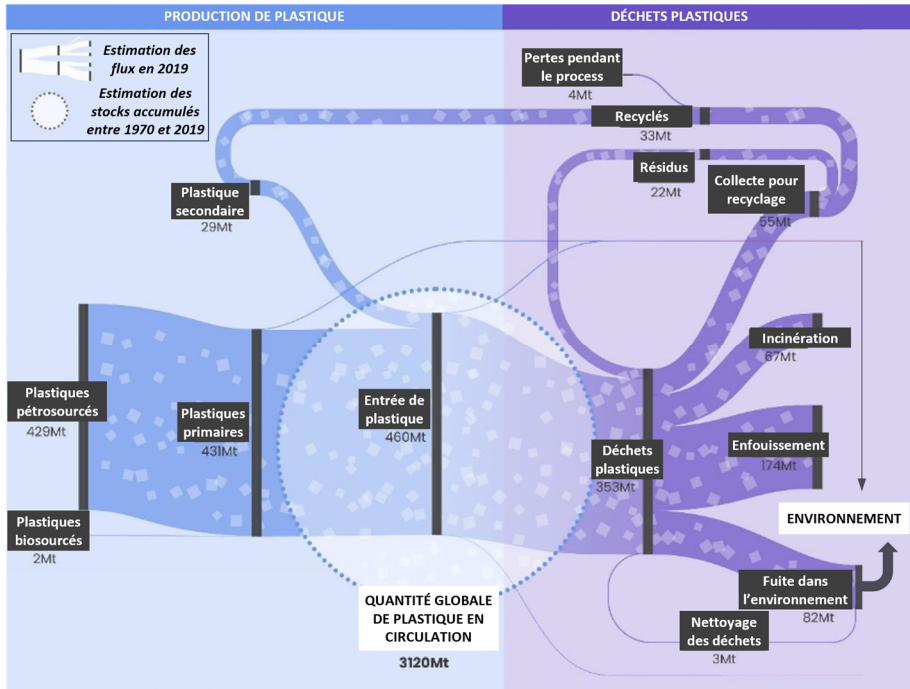


Figure 1.3: Production mondiale de plastiques et de déchets plastiques en 2019 et leur devenir. Adapté de l'OCDE, 2022.<sup>16</sup>

La quantité de déchets plastiques entrant dans l'océan tous les ans par les rivières serait comprise, selon les estimations entre 1,15 et 2,14 million de tonnes (Lebreton *et al.*<sup>21</sup>) ou 0,47 et 2,75 millions de tonnes (Schmidt *et al.*<sup>22</sup>). Par ailleurs, avec près de la moitié de la population mondiale résidant à moins de 31 km des côtes, la probabilité qu'il existe des rejets directs de la terre vers l'océan est significative.<sup>23,24</sup> Enfin, les activités maritimes sont aussi une source de déchets plastiques non négligeable, puisque Lebreton *et al.* ont montré que la plupart des débris retrouvés dans le gyre, de taille supérieure à 5cm, pouvaient être retracés à des activités de pêche.<sup>25</sup> De manière globale, Jambeck *et al.* ont calculé qu'entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de déchets plastiques étaient déversés dans l'océan tous les ans.<sup>19</sup> Ces chiffres ont récemment été contredit par Kaandorp *et al.* qui estiment cette quantité à 0,5 millions de tonnes.<sup>26</sup>



## 1. 2. Des macroplastiques aux nanoplastiques

### 1. 2. 1. Les phénomènes de dégradation dans l'environnement

Au cours de leur vie, sous l'action de différents facteurs tels que les rayonnements, la température, les contraintes mécaniques ou les attaques biologiques, les plastiques subissent des phénomènes de dégradation qui peuvent entraîner des changements à l'échelle moléculaire (fragmentation des chaînes macromoléculaires ou oxydation des groupements terminaux par exemple) et des changements à l'échelle macroscopique, que ce soit des modifications de propriétés physico-chimiques (vieillessement) et structurelles (fissuration et fragmentation).

Dans l'environnement, le principal facteur, est la photodégradation due aux rayonnements UV et visibles, du soleil.<sup>2</sup> A l'échelle moléculaire, ces rayonnements, associés à l'oxygène, vont créer des scissions dans les chaînes polymériques, ce qui peut amener à la formation d'oligomères et/ou à de nouveaux groupements terminaux, en particulier des groupements carboxyles.<sup>27</sup> A l'échelle macroscopique, des fissures et fragmentations sont observées en particulier sur les parties des débris plastiques exposés au soleil (cf. Figure 1.5 A), accompagnées de taux d'oxydation plus élevés (différence particulièrement visible sur les débris parallélogrammiques qui flottent préférentiellement avec la même face exposée au soleil).<sup>28,29</sup>

La fragmentation des déchets plastiques peut également être engendrée par des phénomènes de dégradation mécanique, via l'action des vagues par exemple,<sup>3</sup> ou de biodégradation par l'action de micro-organismes vivant à la surface des débris.<sup>4,30</sup> Dans les deux cas, la dégradation est favorisée lors d'une action cumulée avec les rayonnements UV, grâce, par exemple, à la réduction de la taille des chaînes polymériques, plus facilement assimilables par les micro-organismes.<sup>27</sup>

### 1. 2. 2. Macro-, méso-, micro- et nanoplastiques : classification et définitions.

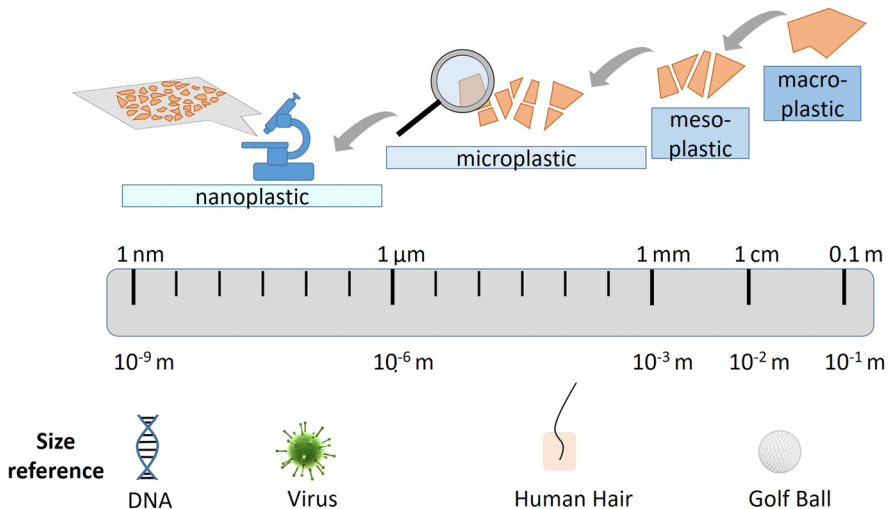
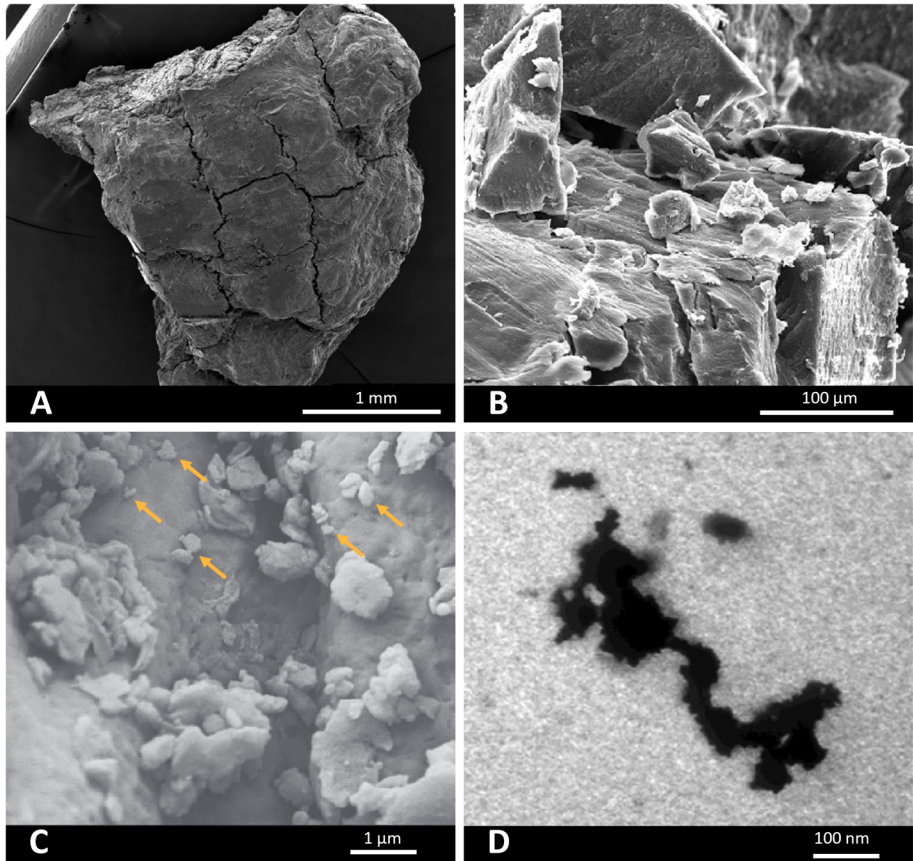


Figure 1.4: Classification des particules de plastique en fonction de leur taille, définition selon Hartmann *et al.* Adapté de Mattern.<sup>31</sup>

Au travers des phénomènes de dégradation présentés précédemment, les débris plastiques sont fragmentés en particules de plus en plus petites, comme illustré dans la Figure 1.4 et la Figure 1.5. En effet, les premières publications reportant la présence de petits débris plastiques (< 0,5 cm) dans les océans datent de 1972<sup>32</sup> et 1974,<sup>33</sup> respectivement. La Figure 1.5 présente à titre d'exemple des petits débris issus de la dégradation de plastiques dans l'environnement ou en conditions contrôlées, couvrant une large gamme de tailles, jusqu'à quelques dizaines de nanomètres, observés par microscopie électronique à balayage (MEB) ou microscopie électronique en transmission (TEM).<sup>34</sup>

Les différents débris plastiques sont généralement définis en premier lieu par leur taille, mais les nomenclatures utilisées pour classer les débris plastiques varient parfois entre les publications, notamment pour définir le seuil de taille entre nanoplastiques et microplastiques (100 nm ou 1000 nm).<sup>10,35</sup> Afin d'harmoniser les travaux, la norme ISO/TR 21960:2020 a proposé la classification suivante (cf. Figure 1.4): les nanoplastiques ou NP (entre 1 et 1000 nm), les microplastiques ou MP (entre 1 et 1000 µm), les mésoplastiques (entre 1 mm et 1 cm) et les macroplastiques (>1cm),<sup>36</sup> définitions en accord avec les définitions proposées par Gigault *et al.* en 2018,<sup>37</sup> et Hartmann *et al.* en 2019<sup>35</sup>. Gigault *et al.* proposent quant à eux de s'appuyer sur les propriétés des particules pour définir les nanoplastiques, au-delà de leur seule taille.<sup>10</sup> Dans la suite de manuscrit, les nanoplastiques seront définis selon les recommandations de la norme ISO/TR 21960:2020 tout en gardant toujours en tête les propriétés colloïdales des nanoplastiques. Des exemples de méso-, micro- et nanoplastiques sont présentés dans la Figure 1.5.

En termes de classification, il existe aussi une distinction au sein des microplastiques ou nanoplastiques. Ils sont qualifiés de « primaires » quand ils ont été fabriqués intentionnellement, pour les cosmétiques par exemple. Ils sont qualifiés de « secondaires » quand ils sont issus de la dégradation de déchets plastiques plus gros.<sup>35</sup>



**Figure 1.5:** Images MEB d'un mésoplastique <sup>29</sup> (A), de microplastiques <sup>38</sup> (B), échantillonnés dans le gyre l'océan Atlantique Nord, et de nanoplastiques produits par fragmentation mécanique de polystyrène expansé <sup>34</sup> (C) ou image TEM de nanoplastiques produits par photodégradation de microplastiques échantillonnés dans le gyre l'océan Atlantique Nord <sup>37</sup> (D).

### *1. 2. 1. Occurrence des plus petits débris de plastique et leurs interactions avec le vivant*

#### *1. 2. 1. 1. Microplastiques*

Les microplastiques ont été observés tout autour du globe, jusqu'à des zones éloignées telles que la mer Arctique,<sup>5</sup> en eaux profondes,<sup>39</sup> ou encore dans la neige au sommet de montagnes, mettant en évidence non seulement un transport dans les milieux aquatiques mais aussi un transport atmosphérique des particules, et donc une probable ubiquité.<sup>7,8,40</sup>

Cependant, comprendre leur transport et estimer leur quantité dans les différents compartiments est encore un défi en raison des nombreux paramètres qui rentrent en compte. Dans l'océan par exemple, la répartition des microplastiques dans la colonne d'eau est complexe et dépendante de nombreux facteurs, comme la flottaison qui peut elle-même être influencée par différents phénomènes comme la formation d'un biofilm. Différentes estimations ont cependant été faites

pour les microplastiques. Le nombre de microplastiques flottant à la surface des océans a été estimé à plus de 170 trillions de particules, ce qui équivaut à plus de 2 millions de tonnes de microplastiques, mais ces calculs ne comptent que les débris de plastique pouvant être échantillonnés par des filets (généralement des filets Manta) sur l'extrême surface (généralement 25 cm) et avec des seuils de coupure entre 53 et 505  $\mu\text{m}$ .<sup>41</sup> Kaandorp *et al.* reportent quant à eux des valeurs de 51 milles tonnes de particules inférieures à 5 mm, 700 milles tonnes de particules mesurant de 5 mm à 20 cm. Leurs résultats ont aussi montré que les particules inférieures à 0,8 mm étaient en majorité dans les eaux profondes des océans (par rapport aux deux autres réservoirs marins étudiés : les zones côtières et la surface des océans).<sup>26</sup>

On estime donc que les microplastiques sont présents dans de nombreux milieux, en quantités significatives. Les organismes vivants sont donc exposés à ces petits débris de plastiques avec un risque de les ingérer. Ainsi, des microplastiques ont été retrouvés dans différents organismes recensés par Phuong *et al.* et Peng *et al.*<sup>42,43</sup> Parmi ces organismes on retrouve des organismes benthiques,<sup>44-46</sup> organismes planctoniques,<sup>47,48</sup> des bivalves comme les moules<sup>49</sup> ou les huîtres,<sup>50</sup> des poissons,<sup>51</sup> des oiseaux<sup>52</sup> ou encore des mammifères marins tels que des requins.<sup>53,54</sup>

En plus de l'exposition par les milieux, les organismes sont aussi susceptibles d'être exposés aux débris plastiques *via* leur alimentation. Des phénomènes de transfert trophique ont en effet été observés à plusieurs reprises entre, par exemple, du zooplancton et des crustacés,<sup>55</sup> des moules et des crabes,<sup>56</sup> entre les crustacés et des poissons,<sup>57</sup> ou encore du zooplancton et des saumons.<sup>58</sup>

### 1. 2. 1. 2. Nanoplastiques

Bien que les études soient moins nombreuses que pour les microplastiques, principalement en raison de difficultés analytiques, les nanoplastiques ont été détectés dans l'environnement à plusieurs reprises (*cf.* Tableau 1.1) dans des échantillons naturels d'eau de mer,<sup>59,60</sup> d'eau douce,<sup>61</sup> de sable<sup>62</sup> ou de sol.<sup>63</sup> Des nanoplastiques ont également été détectés dans la neige des Alpes,<sup>8</sup> du Groenland et de l'Antarctique,<sup>6</sup> des zones qui devraient être exemptes de plastique, ce qui comme pour les microplastiques met en évidence leur transport atmosphérique, et donc leur ubiquité. Des nanoplastiques ont également été détectés dans le sang humain<sup>64</sup> et dans le thé préparé avec des sachets de thé en fibres synthétiques.<sup>65,66</sup> En termes de teneurs, la concentration de nanoplastiques a été mesurée en moyenne à 4,2  $\mu\text{g/L}$  dans la mer des Wadden aux Pays-Bas,<sup>60</sup> 13,2 ng/mL dans la glace du Groenland et 52,3 ng/mL dans la glace d'Antarctique.<sup>6</sup> Comme pour les microplastiques, ces valeurs de concentration sont dépendantes des seuils de coupure des méthodes de collecte des échantillons qui ne correspondent pas forcément à la définition en taille des NP et sous donc probablement sous estimées, si l'on considère toute la gamme 1-1000 nm.

## CHAPITRE 1. Synthèse bibliographique

**Tableau 1.1:** Récapitulatif des concentrations en nanoplastiques mesurées en milieu aquatique.<sup>67</sup>

Type d'échantillon	Pays	Type	Taille (nm)	Concentration moyenne (µg/L)	Méthode	Reference
Eau de rivière	U.K.	PS	<450	241,8	Py-GC-ToF	Sullivan <i>et al.</i> <sup>68</sup>
Neige	Autriche	PET, PP, PE, PS	<200	15,1(PET); 29,5(PP); 25(PE); 5(PS)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>8</sup>
Eau de rivière	Chine	PP, PE, PET, PS, PVC, PMMA	<200	0,283–0,793 (0,117–0,389 PP; 0,088–0,242 PE; 0,011–0,079 PET; 0,007–0,058 PS; 0,006–0,057 PVC; 0–0,046 PMMA)	Py-GC-MS	Xu <i>et al.</i> <sup>69</sup>
Glace	Danemark	PE, PET, PS, PVC, PP/PPC, Tire wear	<200	13,2 (6,5 PE; 2,7 PET; 0,57 PP/PPC; 0,11 PS; 0,11 PVC; 3,2 Tire wear)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>6</sup>
Eau douce	Suède	PVC, PE, PET	<200	122 (PVC); 276 (PE); 61 (PET)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>61</sup>
Eau douce	Russie	PVC, PS	<200	109 (PVC); 15 (PS)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>61</sup>
Eau de rivière	Thaïlande	PS, PVC, PET, PE, PP, PS, Others	<20–450	336 (189–488)	SEM-EDS	Wibuloutai <i>et al.</i> <sup>70</sup>
Eau de mer	Chine	PS; PMMA	<1000	7,35 (PS); 9,25 (PMMA)	Py-GC-MS	Zhou <i>et al.</i> <sup>71</sup>
Eau de mer	Pays-bas	PS	<200	4,2 (2,7–6,5)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>60</sup>
Eau de mer	Antarctique	PE, PP, PET	<200	52,3 (19,8–38,0 PE; 9,0–20,7 PP; 8,3–8,9 PET)	TD-PTR-MS	Materić <i>et al.</i> <sup>6</sup>

A notre connaissance, à l'exception de l'étude portant sur le sang humain,<sup>64</sup> il n'y a pas encore d'études reportant la présence et la quantification de nanoplastiques dans des organismes en milieu naturel, en raison de la difficulté à quantifier de si petits débris plastiques dans des matrices complexes.

En conclusion, il existe encore un réel besoin d'information sur l'occurrence des nanoplastiques dans l'environnement et dans les organismes vivants, en se basant sur les quelques données disponibles et celles concernant les microplastiques, on peut supposer que l'ubiquité des nanoplastiques est très probable. De plus, s'il est possible, compte tenu de leur taille, qu'en termes de masses, les nanoplastiques représentent des quantités inférieures à celles de débris plus gros, il est probable qu'en termes de nombre de particules et de surface déployée, les valeurs soient très élevées (*cf.* Figure 1.6).<sup>10</sup>

### I. 3. La problématique particulière des nanoplastiques

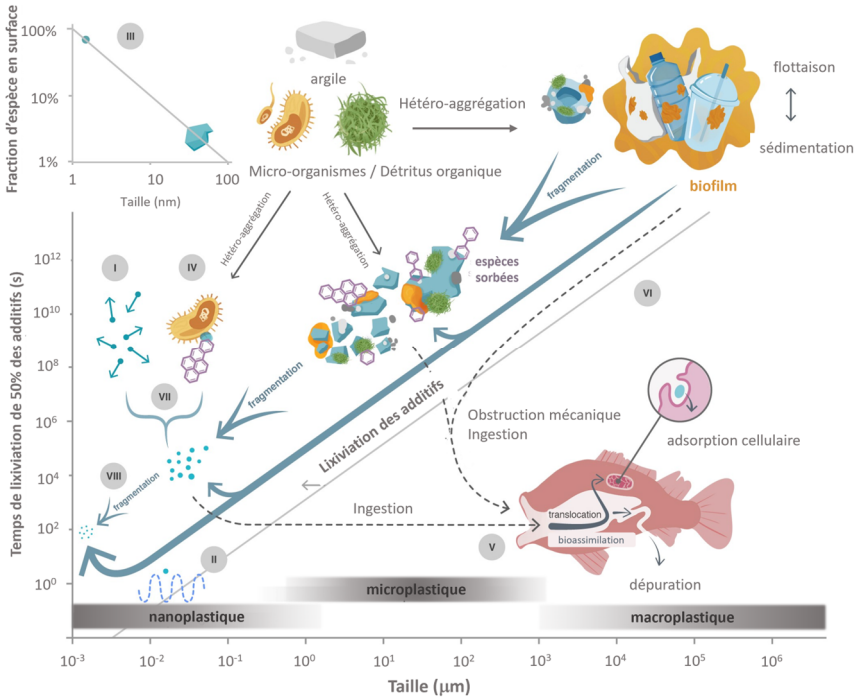
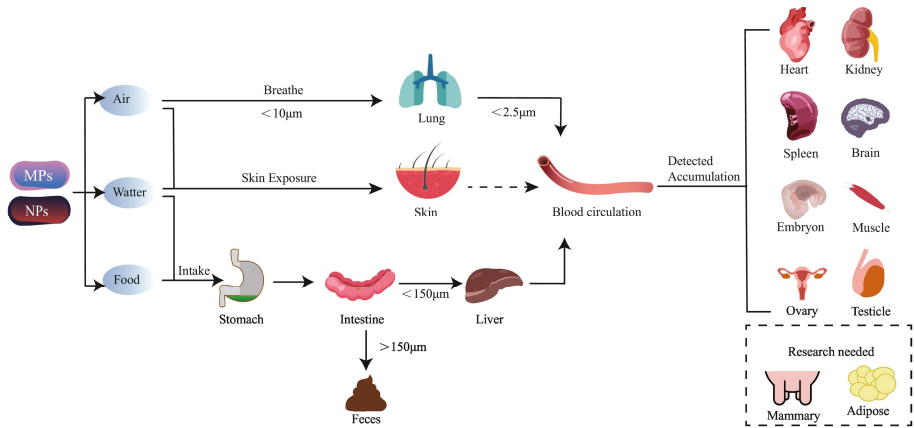


Figure 1.6: Schéma récapitulatif des transformations et caractéristiques des débris plastiques dans l'environnement jusqu'à l'échelle nanométrique. Adapté de Gigault *et al.* 2021<sup>10</sup>

#### I. 3. 1. Translocation

En comparaison avec les débris plastiques plus gros, les nanoplastiques ont une taille inférieure au micromètre,<sup>35</sup> ce qui rend d'autant plus possible les phénomènes de translocation, c'est-à-dire le passage des parois des cellules et donc l'assimilation des particules au sein des organismes. Les phénomènes de translocation ont fait l'objet de discussions dans plusieurs revues de littérature.<sup>9,72</sup> En se basant sur les études portant sur les rats et les souris, Dong *et al.* ont proposé des limites de tailles maximales pour la translocation des nanoplastiques *via* les trois principales voies d'exposition (voie respiratoire, cutanée et digestive) pour des animaux de type monogastrique. D'après leur étude, les nanoplastiques risquent d'être assimilés par la voie respiratoire et la voie digestive.<sup>9</sup> D'autres exemples de translocations ont été observés tel que le passage de l'épithélium de saumons par des nanoplastiques marqués au palladium d'environ 200 nm de diamètre.<sup>73</sup> Cependant, d'autres études ont montré une absence de translocation pour les tailles similaires.<sup>72</sup> Par exemple, Hansen et Peters ont étudié la perméabilité des membranes péritrophiques pour des particules de différentes tailles et ils ont observé une pénétration des particules de 130 nm de diamètre mais pas de translocation pour celles de 327 nm.<sup>74</sup>



**Figure 1.7:** Différentes voies d'exposition des micro- et nanoplastiques pour les animaux de type monogastrique, et limites de taille pour la translocation des débris plastiques. Issu de Dong *et al.*<sup>9</sup>

### 1. 3. 2. Effet cheval de Troie

Une fois dans l'organisme, les nanoplastiques peuvent être source de toxicité directe, ou indirecte par le biais du transfert de substances toxiques présentes au cœur ou à la surface des débris plastiques. Ce phénomène est appelé l'effet cheval de Troie. Cet effet est d'autant plus important que la surface spécifique est grande, or les nanoplastiques ont une surface spécifique très grande comparée à leur volume (*cf.* Figure 1.6 A).<sup>10</sup>

Parmi les substances toxiques que les nanoplastiques peuvent transporter, on trouve en premier lieu les additifs qui sont présent dès la conception des plastiques ajoutés à la formulation du matériau pour en améliorer les propriétés et/ou réduire leurs coûts.<sup>75</sup> En 2015, 25 millions de tonnes d'additifs ont été produits en Europe.<sup>1</sup> Il existe différentes familles tels que les plastifiants, les retardateurs de flamme, les antioxydants, les stabilisants et les pigments (organiques ou inorganiques). Il existe de nombreux additifs dont la toxicité est avérée (bisphénol A, phtalates par exemple), mais compte tenu du grand nombre de substances utilisées (plus de 5800), la toxicité des additifs, notamment en cocktail, est un enjeu de recherche.<sup>76,77</sup>

Les nanoplastiques pourraient aussi être vecteurs d'espèces pathogènes. En effet, une fois dans l'environnement, les débris plastiques sont rapidement recouverts par un biofilm composé de différentes communautés microbiennes colonisées à la surface des plastiques. Cet écosystème à part entière est appelé la « Plastisphère » et certaines études ont montré qu'il pouvait contenir des organismes pathogènes.<sup>30,78</sup>

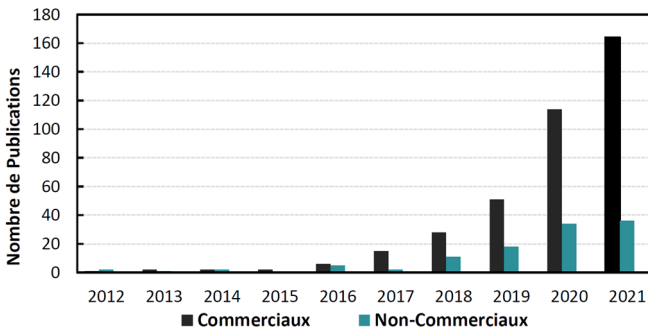
Enfin, les nanoplastiques peuvent également transporter des polluants organiques ou inorganiques, comme des métaux. La présence de polluants dans des débris plastiques a déjà été démontrée à plusieurs reprises, par exemple dans des débris de polyéthylène du gyre de l'Atlantique Nord,<sup>79</sup> ou des microplastiques échantillonnés sur une plage en Guadeloupe.<sup>80</sup> Avec leur surface spécifique élevée, les nanoplastiques ont d'autant plus de chance d'accumuler, lors de leur séjour dans l'environnement, des polluants par adsorption à leur surface, ou absorption au cœur de la matrice polymère. La capacité des petits débris plastiques à accumuler des polluants a fait l'objet de plusieurs revues de la littérature par Alimi *et al.*, Rai *et al.* et Zhang *et al.*<sup>81-83</sup> et leur toxicité indirecte chez les organismes exposés à également fait l'objet d'une revue par Sun *et al.*<sup>84</sup>

Que ce soit à cause d'une toxicité intrinsèque, ou du fait de leur capacité à transporter des composés toxiques ou organismes pathogènes, associée à leur potentielle translocation à l'intérieur même des organismes, les nanoplastiques représentent un risque pour les organismes vivants. Il est donc nécessaire de comprendre leurs mécanismes d'accumulation, d'assimilation et de toxicité. Cependant, pour l'instant, la taille des nanoplastiques, leur relative faible concentration dans l'environnement et surtout la présence d'autres composés, matières organiques, sels, micro-organismes, ne permettent pas de les collecter pour les utiliser dans des études en laboratoire. Des nanoplastiques modèles sont donc élaborés pour imiter les nanoplastiques présents dans l'environnement et ainsi pouvoir étudier, en laboratoire, leur comportement et leurs interactions avec le vivant.

## II. Les nanoplastiques modèles

### II. 1. Utilisation des nanoplastiques modèles

Les nanoplastiques modèles ont pour but d'imiter les nanoplastiques présents dans l'environnement et ainsi pouvoir étudier, en laboratoire, leur comportement et leurs interactions avec le vivant. Comme on peut le voir dans la Figure 1.8, la plupart des études (82% en 2021) sont réalisées à l'aide de nanoparticules de plastiques commerciales fournies par les industries chimiques traditionnelles.<sup>12,85</sup>



**Figure 1.8:** Origine des modèles utilisés dans la littérature : NP commerciaux (noir) et non commerciaux (bleu) de 2012 jusqu'à 2021. Issu de Aynard, 2022.<sup>85</sup>

Ces nanoparticules de plastiques, généralement aussi appelées latex, ont l'avantage d'être faciles d'accès, d'avoir une taille certifiée et éventuellement des fonctionnalités de surface connues (COOH et NH<sub>2</sub> par exemple). Les particules sont également sphériques et monodisperses, ce qui, bien que cela ne soit représentatif des débris plastiques environnementaux, est utile pour avoir accès à la concentration en nombre de particules et à la surface spécifique correspondante.

Cependant, ces échantillons ne sont pas développés pour être utilisés en tant que nanoplastiques modèles, ce sont le plus souvent des échantillons de calibration/étalonnage pour les techniques d'analyse en taille et les producteurs ne fournissent généralement pas les informations détaillées sur la composition et les propriétés physico-chimiques de leurs latex. Plusieurs travaux ont reporté que leurs compositions chimiques pouvaient entraîner un biais dans l'analyse des résultats quand ils sont utilisés comme nanoplastiques modèles car ils contiennent des additifs, notamment des tensioactifs et/ou des conservateurs, modifiant les propriétés physico-chimiques et la toxicité de l'échantillon.<sup>86</sup> Par exemple, Pikuda *et al.* ont montré que lors de l'exposition de *Daphnia magna* à



des nanoplastiques modèles commerciaux, la toxicité observée était due à l'azoture de sodium (conservateur) et non aux nanoplastiques eux-mêmes.<sup>87</sup> Heinlaan *et al.* ont aussi observé de la toxicité due à des additifs, notamment l'azoture de sodium mais sûrement également à d'autres additifs non identifiés.<sup>88</sup> Par ailleurs, les comportements des nanoplastiques sont régis par des phénomènes de surface, il est donc important que les caractéristiques de surface soient pertinentes et bien caractérisées. Parmi les caractéristiques importantes, on trouve le type de groupements en surface mais aussi le taux de fonctionnalisation, information qui est rarement renseignée par les fabricants. En raison du manque d'informations et de contrôle sur la composition et les propriétés des nanoplastiques modèles commerciaux, l'utilisation de ces derniers pour mieux comprendre le comportement et la toxicité des nanoplastiques environnementaux sont donc déconseillés.

## II. 2. Elaboration de nanoplastiques modèles

Une alternative aux nanoplastiques modèles commerciaux (latex) consiste à les élaborer en laboratoire. Pour cela, il existe différentes méthodes que l'on peut classer selon deux catégories : les méthodes descendantes (ou *top-down*) et les méthodes ascendantes (ou *bottom-up*), présentées dans la Figure 1.9.

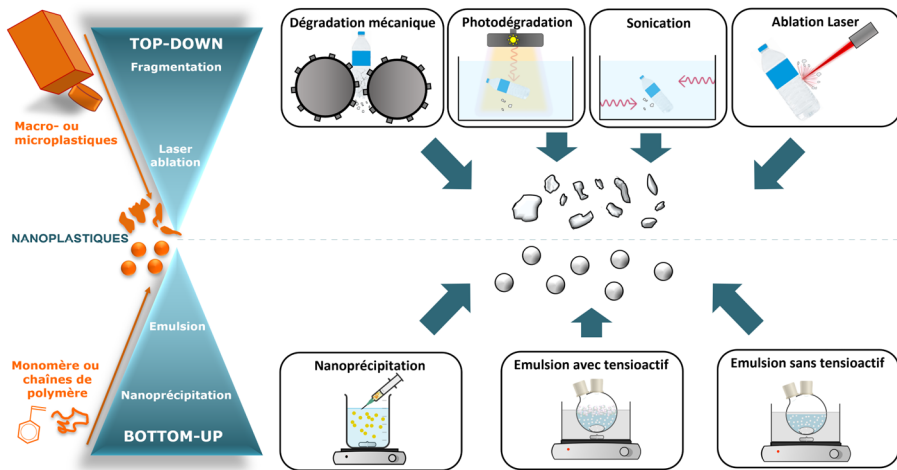


Figure 1.9: Schéma récapitulatif des méthodes par voie descendante (*top-down*) et voie ascendante (*bottom-up*) pour l'élaboration de nanoplastiques modèles. Adapté de Reynaud *et al.*, 2022<sup>12</sup> et Aynard, 2022.<sup>85</sup>

### II. 2. 1. Méthodes descendantes (ou *top-down*)

Les méthodes descendantes (ou *top-down*) consistent à dégrader des échantillons plastiques jusqu'à l'échelle nanométrique. Elles peuvent être utilisées sur des plastiques primaires (vierges, issus de l'industrie) ou secondaires (macro- ou microplastiques récoltés dans l'environnement). Différents procédés sont reportés dans la littérature. La dégradation mécanique est la méthode la plus courante.<sup>89-92</sup> On trouve également des nanoplastiques générés par photodégradation<sup>93-95</sup> par sonication<sup>96</sup> ou par ablation laser.<sup>97</sup>

Les méthodes descendantes permettent d'obtenir des nanoplastiques modèles de tout type de polymère, imitant ceux présents dans l'environnement, c'est-à-dire polydisperses, présentant des

formes irrégulières, des défauts de surface et éventuellement une surface oxydée. Cependant, obtenir de grandes quantités de nanoplastiques par ces méthodes peut être très difficile et chronophage, et peu d'études de toxicité ont pu être réalisées avec ce type de nanoplastiques modèles. Par ailleurs, l'avantage de pouvoir générer des nanoplastiques avec une telle complexité en termes de compositions, formes, etc. est contrebalancé par un manque de reproductibilité des échantillons, et donc des résultats obtenus dans les études les utilisant.

### II. 2. 2. Méthodes ascendantes (ou *bottom-up*)

Les méthodes ascendantes (ou *bottom-up*) correspondent aux méthodes classiques de la chimie colloïdale, pour laquelle il existe plusieurs procédés de préparation de particules de polymère.<sup>98</sup> Elles permettent généralement de réaliser des sphères monodisperses de polymère. On peut globalement différencier deux types d'élaboration : des méthodes partant de chaînes de polymères, telles que la nanoprécipitation, ou des méthodes utilisant des molécules simples (monomères) pouvant être polymérisées telle que la polymérisation en milieu dispersé aqueux, par exemple l'émulsion.<sup>98</sup>

La nanoprécipitation a l'avantage de pouvoir être utilisée sur un grand nombre de polymères différents. Par exemple, on retrouve dans la littérature des cas de production de nanoparticules de PET,<sup>99</sup> poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), poly(acétate de vinyle) (PVAC),<sup>100</sup> PE<sup>101,102</sup>, ou plus récemment PE-LD, PE-HD, PVC, PS et PP.<sup>103</sup> Cependant, la technique étant basée sur la rapide précipitation d'un polymère dissous (dans un solvant organique) lors de son ajout dans un non-solvant du polymère, généralement de l'eau, elle demande d'utiliser des solvants organiques. Les échantillons finaux doivent être purifiés scrupuleusement et l'élimination des solvants organiques toxiques n'est pas toujours quantitative, ce qui est problématique pour l'utilisation des nanoplastiques dans des études toxicologiques. En comparaison, l'émulsion a l'avantage de ne pas utiliser de solvants organiques. En revanche, tous les polymères ne sont pas facilement accessibles avec ce type de polymérisation.<sup>104</sup>

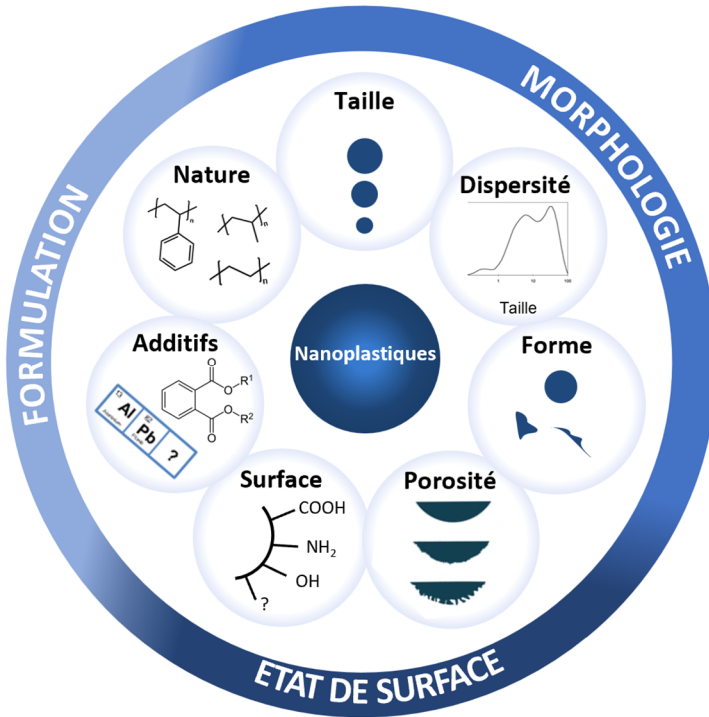
Que ce soit dans la nanoprécipitation ou la polymérisation en émulsion, le recours aux tensioactifs est souvent nécessaire. Cependant, comme expliqué précédemment leur utilisation est déconseillée quand les échantillons sont ensuite destinés aux études (éco)toxicologiques puisqu'ils peuvent modifier les propriétés physico-chimiques des nanoplastiques et leur toxicité. Ceci est également valable pour les tensioactifs biosourcés, qui ont les mêmes propriétés que leur homologues pétrosourcés.<sup>101</sup>

Afin d'obtenir des nanoplastiques modèles sans solvant organique ni tensioactif, des méthodes de polymérisation sans tensioactif ont été développées.<sup>105,106</sup> Dans ce contexte, Pessoni *et al.* ont proposé une méthode pour synthétiser des nanoplastiques sans tensioactif ou autres additifs, grâce à l'ajout d'un comonomère hydrophile, qui a deux rôles : celui de stabiliser les particules finales pour contrôler leur taille et empêcher leur agrégation, et celui de permettre la formation de groupements carboxyles à la surface des particules mimant ainsi l'oxydation de débris oxydés naturellement.<sup>107</sup> Le principe de cette technique est détaillé et comparé à son homologue avec tensioactif dans le Chapitre 2, partie I.

### III. Caractérisations et quantification des nanoplastiques non marqués

Les méthodes analytiques permettant la caractérisation, l'identification et la quantification des nanoplastiques ont fait l'objet de plusieurs revues entre 2019 et 2023 : Schwaferts *et al.*,<sup>11</sup> Cai *et al.*,<sup>13</sup> Enyoh *et al.*,<sup>108</sup> Ivleva,<sup>109</sup> Velimirovi *et al.*,<sup>110</sup> Calwell *et al.*,<sup>111</sup> Fang *et al.*<sup>112</sup>

#### III. 1. Caractérisations des nanoplastiques



**Figure 1.10:** Représentation schématisée des propriétés essentielles des nanoplastiques à caractériser.

Afin de caractériser précisément les nanoplastiques, il convient de connaître leurs différentes propriétés essentielles, schématisées dans la Figure 1.10, qui concernent leur formulation, leur morphologie et leur état de surface.<sup>12,37</sup> Les techniques permettant de caractériser ces propriétés sont très nombreuses, Cai *et al.* en ont par exemple recensé plus d'une vingtaine en 2021,<sup>13</sup> et sont encore l'objet de nombreux travaux de recherches exploratoires. Ci-après, nous avons présenté les principales techniques permettant de caractériser chaque type de propriété mais la liste n'est pas exhaustive.

Concernant la formulation des nanoplastiques, la nature des polymères est la caractéristique la plus importante à connaître. Elle peut être déterminée grâce à des techniques destructives, comme la spectrométrie de masse comme la pyrolyse–chromatographie en phase gazeuse–spectrométrie de masse (Py-GC/MS), ou non destructives comme des techniques spectroscopiques, généralement couplée à la microscopie, telle que la diffusion Raman exaltée par effet de *pointe* (TERS).<sup>108</sup> Ces techniques sont également utilisées pour quantifier en masse ou en nombre les petits débris

plastiques (cf. Partie III. 2. ). Pour compléter la caractérisation de la formulation, les additifs présents dans les débris plastiques peuvent être identifiés et quantifiés par différentes techniques telles que la Py-GC/MS,<sup>113</sup> la thermodésorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse (TD-GC/MS),<sup>114</sup> ou encore d'autres techniques de spectrométrie de masse reportées en détail par da Costa et al.<sup>115</sup>

La taille et la dispersité des nanoplastiques peuvent être déterminées par des techniques de diffusion de lumière parmi lesquelles on trouve la diffusion dynamique de la lumière (DLS, de l'anglais *Dynamic Light Scattering*), la détecteur de diffusion de lumière multi-angle (MALS, de l'anglais *Multi Angle Light Scattering*), l'analyse par diffraction laser (LDA, de l'anglais *laser diffraction analysis*), ou encore l'analyse du suivi individuel de particules (NTA).<sup>11</sup> Il existe également des couplages permettant à la fois une séparation des nanoplastiques et la détermination de leur taille et dispersité en taille, par exemple avec le fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique (A4F, de l'anglais *Asymmetrical flow field-flow fractionation*),<sup>116</sup> ou le couplage FFF-spectroscopie Raman, qui permet également une identification des polymères.<sup>117</sup> La morphologie des nanoparticules peut également être déterminée, en plus de leur taille et dispersité, grâce à la microscopie telles que la microscopie électronique en transmission (MET, ou TEM de l'anglais *Transmission Electron Microscopy*) ou encore la *microscopie électronique à balayage* (MEB, ou SEM de l'anglais *Scanning Electron Microscopy*) et la microscopie à force atomique (AFM, de l'anglais *Atomic Force Microscopy*) qui permet également d'observer la rugosité de surface.<sup>11</sup>

Pour caractériser davantage la surface, la surface spécifique des particules peut être déterminée par adsorption de gaz grâce à la méthode BET (nommée d'après ses créateurs Brunauer, Emmett et Teller).<sup>118</sup> Les fonctionnalités de surface des nanoplastiques peuvent quant à elles être déterminées par différentes méthodes, comme des titrations électrochimiques (potentiométriques, conductimétriques, etc.), ou des méthodes indirectes basées sur la détection de composés tels que des colorants ou des groupements fluorescents, liés de manière covalente ou par des interactions électrostatiques aux groupements à titrer.<sup>119</sup>

### III. 2. Quantification des nanoplastiques

La concentration des nanoplastiques est aussi une information très importante à connaître. Les concentrations peuvent être obtenues en nombre ou en masse, suivant les techniques analytiques utilisées. Certaines techniques mentionnées précédemment comme la microscopie MEB ou la NTA, en plus de renseigner sur la distribution en taille des nanoplastiques, peuvent être utilisées pour avoir accès à leur concentration en nombre.<sup>13</sup> La diffusion de la lumière statique (MALS) et dynamique (DLS) pourraient théoriquement être utilisées pour déterminer la concentration de nanoplastiques, mais elles présentent certaines limitations notamment en termes de concentration (> 0.1 mg/L) ou de formes des particules analysées supposées sphériques.<sup>13,59</sup> La NTA a été utilisée pour déterminer la concentration de nanoplastiques obtenus par dégradation mécanique de polystyrène expansé ou de microplastiques primaires issus de produits cosmétiques,<sup>3,120</sup> ou par photodégradation de différents plastiques (PP, PE, PET et PS).<sup>121,122</sup> La NTA a également été utilisée en combinaison avec du MEB par Hernandez *et al.* pour déterminer les particules relarguées dans le thé préparé avec des sachets de thé en fibres synthétiques.<sup>65</sup> Les techniques de microscopie ont quant à elles l'avantage d'atteindre des concentrations très basses mais elles peuvent être très chronophages pour obtenir une fiabilité statistique. De plus, les résultats peuvent être interférés par

la présence d'agrégats ou d'autres types de particules. En effet, ces techniques ne sont pas spécifiques, elles peuvent donc détecter des particules qui ne sont pas des polymères (particules de silice par exemple) tout en les assimilant à des nanoplastiques. C'est d'ailleurs l'hypothèse qu'ont émis Busse *et al.* pour expliquer le grand nombre de particules émises obtenues dans le thé par Hernandez *et al.*<sup>66</sup> Quelques études ont testé une combinaison entre microscopie MEB et spectroscopie Raman, qui a montré la possibilité de détecter et d'identifier des nanoplastiques à plusieurs reprises,<sup>112,123,124</sup> mais avec de nombreuses difficultés.<sup>109</sup>

Les concentrations massiques des nanoplastiques peuvent quant à elles être obtenues grâce à la spectrométrie de masse. La technique la plus couramment utilisée pour les microplastiques est la Py-GC/MS et elle a également été utilisée pour détecter<sup>59,62,63</sup> ou quantifier des nanoplastiques.<sup>69,71</sup> Cette technique peut aussi être utilisée avec un analyseur à temps de vol (Py-GC/ToF), plus sensible, qui permet d'atteindre des plus petites particules ou à plus faible concentration.<sup>68</sup> De nombreuses études ont aussi utilisé la thermodesorption couplée à la spectrométrie de masse par *réaction de transfert de proton* (TD-PTR/MS) qui permet une haute sensibilité et une haute résolution en masse, et qui a permis la quantification de nanoplastiques dans des échantillons environnementaux (*cf.* Tableau 1.1).<sup>6,60,61</sup> Cependant, ces techniques reposent sur la détection de produits de dégradation. Or ces produits de dégradation ne sont pas toujours spécifiques aux polymères.<sup>125-127</sup> A titre d'exemple, la difficulté de quantifier le polystyrène est détaillée dans le Chapitre 3, partie I. 1. 4. 1.

### III. 3. Préconcentration, séparation et digestion

Si les techniques présentées précédemment permettent d'analyser des nanoplastiques seuls ou dans des milieux simples comme de l'eau distillée, leur détection et leur quantification dans des échantillons environnementaux sont en revanche plus compliquées, tout d'abord à cause de leur faible concentration, et ensuite à cause de la matrice plus ou moins complexe dans laquelle ils se trouvent. Pour atteindre des concentrations analysables, il est possible de réaliser des étapes de préconcentration, telles que de l'évaporation, de l'ultrafiltration ou encore de l'ultracentrifugation, mais ces méthodes vont généralement aussi concentrer des composés présents dans la matrice de l'échantillon.<sup>11,13,109</sup>

Il existe également des méthodes de séparation, permettant de séparer différentes fractions de particules en fonction de leur taille, et donc potentiellement d'isoler les nanoparticules. Cette séparation peut être réalisée par simple filtration sur membrane, ou grâce à des techniques plus complexes de *fractionnement* par couplage flux-force (FFF) comme l'A4F, ou de chromatographie comme la chromatographie d'exclusion stérique (CES).<sup>11,13,109</sup> Ces méthodes de séparation peuvent être utiles pour retirer une partie de la matrice mais elles ne permettent pas de séparer les colloïdes naturels des nanoplastiques et elles ne permettent pas toujours des taux de récupération de 100%.

La seule étape de séparation des particules ne permettant pas de retirer tous les éléments qui peuvent interférer avec les analyses, il est souvent nécessaire d'ajouter une ou plusieurs étapes de digestion de la matrice (étapes effectuées généralement avant la séparation). Pour les microplastiques, de nombreux protocoles ont été en place que ce soit par des digestions acides (avec HCl ou HNO<sub>3</sub> par exemple), basiques (avec KOH *p. ex.*), enzymatiques (avec la protéinase K *p. ex.*), avec des agents oxydants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *p. ex.*), ou encore en combinant plusieurs de ces méthodes. Dans le cas des nanoplastiques, trouver un protocole de digestion est plus complexe. En raison de leur petite taille, il existe un risque d'autant plus élevé que la digestion puisse endommager les

nanoplastiques ou entraîne leur agrégation. Cependant, parmi les différentes études ayant testé des protocoles sur les nanoplastiques (cf. Cai *et al.*<sup>13</sup>), la grande majorité n'a pas étudié leur effet sur les particules. Il existe donc un réel besoin d'études précises sur les protocoles de digestion des échantillons environnementaux de nanoplastiques, sans quoi leur quantification dans des matrices complexes restera impossible.<sup>11</sup>

### IV. Les techniques de marquage

Nous avons vu précédemment qu'il existe des techniques analytiques permettant de quantifier, en nombre ou en masse, les nanoplastiques dans des matrices très simples. Cependant, dès lors que la matrice est trop complexe, les échantillons doivent subir de nombreuses étapes de préparation, pour séparer les débris plastiques et les purifier de potentiels interférents, étapes qui en plus d'être longues et fastidieuses peuvent engendrer un taux de récupération bas et non répétable, ou une dégradation des particules, et ainsi fausser les résultats.

Pour remédier à cette problématique, de nombreuses études utilisent des techniques de marquage qui permettent de réduire des limites de quantification et/ou de minimiser les interférences avec la matrice. Il existe plusieurs types de marqueurs (métalliques, fluorescents, isotopiques, etc.) et ces derniers peuvent être incorporés après l'élaboration des nanoparticules, par des phénomènes d'adsorption, ou directement pendant la synthèse des nanoplastiques modèles. Dans le premier cas, la méthode a l'avantage de pouvoir être utilisée pour quantifier des nanoplastiques environnementaux. Des fluorophores et des nanoparticules d'or ont par exemple été utilisés pour quantifier des nanoplastiques dans des eaux minérales.<sup>128,129</sup> Cependant, dès que les matrices sont trop complexes, ces techniques de marquage, qui ne sont pas spécifiques aux nanoplastiques, ne permettent pas de les quantifier de manière juste et précise.

Dans la suite de ce manuscrit, seul le marquage réalisé au moment de l'élaboration des nanoplastiques modèles sera considéré. L'analyse de la littérature montre différentes méthodes de marquage utilisant des fluorophores, métaux, lanthanides ou isotopes, méthodes qui sont détaillées ci-après.

#### IV. 1. Le marquage fluorescent

Parmi les techniques de marquage, la plus couramment utilisée est la fluorescence pour plusieurs raisons. Tout d'abord, des nanoplastiques fluorescents commerciaux sont disponibles à l'achat. De plus, ils peuvent être analysés par des techniques largement utilisées dans les laboratoires de biologie. Parmi ces techniques, on trouve de l'imagerie avec la microscopie de fluorescence permettant de localiser les nanoplastiques, mais des analyses quantitatives peuvent également être faites par spectrophotométrie de fluorescence ou en utilisant un lecteur de plaques en fluorescence.

Cependant, le marquage fluorescent peut mener à des conclusions erronées. Tout d'abord, les tissus biologiques peuvent produire eux-mêmes de la fluorescence (phénomène appelé autofluorescence), en raison des acides aminés présents dans les tissus biologiques.<sup>130</sup> Ce phénomène a été décrit par exemple par Booth *et al.*, ou Catarino *et al.*, qui ont observé de l'autofluorescence dans les daphnies ou dans les larves de poissons-zèbre témoins.<sup>131,132</sup>

Enfin et surtout, lorsque le marqueur fluorescent n'est pas lié de façon covalente au polymère, ce qui est souvent le cas des nanoplastiques fluorescents commerciaux, ce dernier peut être relargué

par osmose classique, sous l'effet d'un changement de pH, ou à cause d'affinités plus fortes pour d'autres composés par exemple.<sup>86,132</sup> Ce phénomène a tout d'abord été mis en évidence par Catarino *et al.* qui ont exposé des larves de poissons-zèbres à des nano- ou microplastiques fluorescents commerciaux, ou aux solutions obtenues par dialyse des particules.<sup>133</sup> Dans les deux conditions, les images montrent de la fluorescence à l'intérieur des organismes, ce qui révèle une fuite des fluorophores pendant la dialyse et leur capacité à s'accumuler dans les tissus des larves. De manière similaire, Schür *et al.* ont montré, en exposant des *Daphnia magna*, que la fluorescence observée dans les poches lipidiques était due à la migration du marqueur fluorescent lipophile et non à la présence de micro- ou nanoplastiques.<sup>134</sup>

Pour pouvoir utiliser des nanoplastiques marqués par fluorescence, des précautions doivent être prises pour vérifier l'absence d'autofluorescence de la matrice et de fuite des fluorophores dans les conditions de l'expérience, dans le cas de fluorophores liés de façon non covalente au polymère. Pour ne pas avoir de risque de relargage, il est également possible d'utiliser des composés fluorescents pouvant être incorporés de manière covalente au polymère. Lors de la synthèse, par exemple, des fluorophores portant un groupement vinylique tel que les pyrènes acrylates ou les dérivés de fluorescéine peuvent être choisis en ce sens.<sup>135,136</sup>

### IV. 2. Le marquage aux métaux (ou métalloïdes)

Une autre technique de marquage est celui aux métaux (ou métalloïdes). L'ajout de ces éléments peut être fait en polymérisant le polymère autour d'un cœur métallique, ou en ajoutant des métaux sous forme de nanoparticules ou d'ions uniformément dans le polymère. Ce marquage permet d'avoir accès à des techniques très sensibles, telles que la spectrométrie de masse à plasma induit par couplage inductif classique (ICP-MS) ou en mode comptage individuel de particules : *Single particle* en anglais (SP-ICP-MS). Ces outils analytiques peuvent aider à détecter des particules à des concentrations basses (entre  $8.4 \cdot 10^5$  et  $3,5 \cdot 10^8$  particules/L, pour des nanoparticules marquées à l'or) si le métal est choisi avec soin pour éviter un bruit de fond élevé des matrices.<sup>129</sup>

Cependant, tout comme avec la fluorescence, le marquage métallique consiste à ajouter un autre composé au nanoplastique, ce qui modifie nécessairement ses propriétés. Si cela n'est pas fait avec précaution, cette technique peut modifier significativement la densité des nanoplastiques et, par conséquent, leur comportement. De plus, il existe un risque de relargage des métaux plus ou moins fort selon la méthode de préparation des nanoplastiques modèles. Le risque sera plus fort pour les métaux sous forme ionique que pour les métaux sous forme particulaire (notamment situés au cœur des nanoplastiques). Par ailleurs, si une partie des métaux est à la surface des débris, ils pourraient modifier les propriétés physico-chimiques des nanoplastiques, ainsi que leur toxicité.

Le marquage avec un cœur métallique a été utilisé à plusieurs reprises pour faire des nanoplastiques marqués. Mitrano *et al.* ont synthétisé des nanoplastiques modèles de polystyrène marqués par du palladium (Pd).<sup>137</sup> Ces nanoplastiques ont été utilisés pour déterminer le taux de rétention des nanoplastiques par les stations d'épuration,<sup>137</sup> mais aussi par Clark *et al.* pour évaluer la translocation des nanoplastiques à travers de l'épithélium de saumons<sup>73</sup> et par Tamayo-Belda *et al.* pour estimer l'accumulation des NP dans les daphnies.<sup>138</sup> Dans ces études, les nanoplastiques modèles ont été quantifiés par ICP-MS, après digestion au  $\text{HNO}_3$ . De manière similaire, Vicentini *et al.* ont synthétisé des nanoplastiques marqués par de l'aluminium (Al), et des fluorophores, pour les quantifier par ICP/MS dans des daphnies.<sup>139</sup> Zhang *et al.* ont eux réalisés des nanoplastiques marqués

par du fer, afin de réaliser de l'imagerie par IRM (imagerie par résonance magnétique) combiné à des analyses par spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES).<sup>140</sup> Enfin, plusieurs travaux ont reportés l'élaboration de nanoplastiques marqués par des particules d'or, qui ont pu être analysés avec des techniques quantitatives mais destructives (ICP-MS ou SP-ICP-MS),<sup>141</sup> ou de l'imagerie Raman, grâce aux propriétés de diffusion *Raman* exaltée de *surface* (*SERS de en anglais, surface-enhanced Raman scattering*) des particules d'or,<sup>142</sup> ou encore une combinaison des deux techniques.<sup>143</sup>

### IV. 3. Le marquage aux lanthanides ou particules luminescentes

Les lanthanides sont une famille du tableau périodique ayant la capacité de convertir des photons de basse énergie (absorption dans le proche infrarouge), en photons d'énergie plus élevée (émission dans le visible ou UV), ce qui permet de synthétiser des particules dites luminescentes ou « à conversion ascendante » (ou « *upconverting* » en anglais).<sup>144</sup> Pour réaliser les nanoplastiques marqués, les lanthanides peuvent être ajoutés, pendant la synthèse, sous forme d'ions, de complexes, ou sous forme de nanoparticules inorganiques, ou bien après la synthèse, par adsorption simple à la surface des nanoplastiques, bien que cette méthode comporte de forts risques de perte du marqueur.<sup>145</sup> Comme les nanoplastiques fluorescents, les nanoplastiques marqués aux lanthanides peuvent être suivis par des techniques d'imagerie par exemple de l'imagerie temporelle (*Time-gated imaging*). En comparaison avec les fluorophores, les signaux produits par les lanthanides ont l'avantage d'être différenciables de l'autofluorescence des tissus et d'être plus stables.<sup>130,146</sup> Les lanthanides peuvent aussi être analysés par des techniques analytiques destructives comme l'ICP-MS ou la SP-ICP-MS.

Des nanoparticules de polymères marquées aux lanthanides ont été utilisées à plusieurs reprises en tant que nanoplastiques modèles. Munich *et al.* ont utilisé des nanoplastiques de polystyrène et de PVC marqués par du gadolinium (Gd) sous forme ionique qu'ils ont quantifié par ICP-MS et SP-ICP-MS, pour étudier le transfert trophique entre les salades, cultivées dans un sol contaminé, des larves d'insectes et des poissons.<sup>147</sup> Si la méthode a permis le suivi des particules dans les différents organismes, du gadolinium libre a été détecté dans les tissus des poissons, suggérant une potentielle dégradation des nanoplastiques ou un relargage des marqueurs.<sup>147</sup> Luo *et al.* ont quant à eux synthétisé des nanoplastiques de polystyrène marqués à l'euprotium (Eu) sous forme de complexe pour quantifier leur transfert dans du blé et dans des salades. Les particules ont été quantifiées par ICP-MS et ont été visualisées dans les plantes par *Time-gated luminescence*.<sup>148</sup> Zhang *et al.* ont également analysé par *Time-gated imaging* des nanoplastiques marqués aux lanthanides, mais cette fois-ci intégrés sous forme de nanoparticules luminescentes composées de lutétium (Lu), d'ytterbium (Yb) et d'erbium (Er). De manière similaire, Yakovenko *et al.* ont réalisé des nanoplastiques modèles marqués avec des particules luminescentes composées d'yttrium (Y), d'ytterbium (Yb) et d'erbium (Er), mais cette fois-ci à base de polyéthylène (HD-PE), par une méthode top-down. Pour cela, les particules luminescentes ont été incorporées dans du PE solubilisé dans une solution de xylène. Après précipitation, le polymère obtenu a été cryo-broyé pour obtenir des micro- et nanoplastiques.<sup>146</sup>

Les lanthanides offrent de nombreux avantages pour suivre les nanoplastiques tant de manière quantitative par des techniques comme la SP-ICP-MS que pour des techniques d'imagerie qui contournent certains problèmes de la microscopie de fluorescence classique. Cependant, comme



pour le marquage aux métaux, l'ajout des lanthanides peut modifier les propriétés des particules telle que leur densité, comme l'ont observé par exemple Munikh *et al.* avec une densité de  $1,33 \text{ g.cm}^{-3}$  pour les nanoplastiques de polystyrène marqués contre  $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$  sans marquage, soit une augmentation de 26%.<sup>147</sup>

### IV. 4. Le marquage isotopique

Le dernier type de marquage utilisé est le marquage isotopique, avec des isotopes stables ou radioactifs. Étant donné que les polymères sont principalement composés d'atomes de carbone et d'hydrogène, différents isotopes peuvent être envisagés : le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^2\text{H}$  en tant qu'isotopes stables, et le  $^{14}\text{C}$  ou le  $^3\text{H}$  pour les isotopes radioactifs. Le marquage peut être introduit grâce à l'utilisation, pendant le processus de polymérisation, de réactifs (généralement les monomères) enrichis par les isotopes souhaités. Ainsi, le marquage est intégré au sein de la chaîne macromoléculaire par des liaisons covalentes, ce qui élimine tout risque de fuite. Même s'ils possèdent des similarités, le marquage radioactif et les traceurs isotopiques stables doivent être considérés séparément, puisque leurs natures sont différentes et les techniques permettant de les détecter aussi.

L'un des principaux avantages du marquage radioactif est qu'il peut être détecté de manière précise et reproductible à des concentrations très faibles, ce qui permet de travailler dans des conditions environnementales. Il offre également la possibilité de suivre les nanoplastiques marqués dans les organismes *in vivo*, et donc d'avoir accès à un suivi temporel réel.<sup>149</sup> Cependant, le marquage aux radioisotopes a également des inconvénients. Les composés radioactifs sont coûteux et ils doivent être manipulés conformément à des réglementations spécifiques, dans des installations dédiées et doivent être analysés par des techniques spécifiques et coûteuses, ce qui limite leur accessibilité.<sup>14,150</sup> Enfin, en raison de la toxicité des éléments radioactifs, une précaution doit être faite pour vérifier les effets du marquage sur les organismes surtout pour des études à long-terme.

Le marquage isotopique a été utilisé à plusieurs reprises, dans le contexte de la problématique environnementale des déchets plastiques, notamment pour étudier leur rôle de vecteur de polluants des microplastiques.<sup>149</sup> Concernant les nanoplastiques, le marquage aux radio-isotopiques a été fait pour la première fois par Al-Sid-Cheikh *et al.* qui ont synthétisé, par une méthode de synthèse ascendante (*bottom-up*), des nanoplastiques de polystyrène à l'aide de styrène marqué au carbone : le styrène- $(^{14}\text{C})_{\beta}$  (ou styrène [méthylène $^{14}\text{C}$ ]).<sup>151</sup> Ils les ont ensuite utilisés pour mieux comprendre l'accumulation et la dépuration des nanoplastiques par des pétoncles (Saint-Jacques) *Pecten maximus*, après exposition à des concentrations très basses ( $< 15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), dans les gammes des premières concentrations retrouvées dans l'environnement (*cf.* Partie 1. 2. 1. 2. ). Deux techniques ont été combinées : le comptage à *scintillation liquide* (ou en anglais *liquid scintillation counting* LSC) a permis de déterminer des niveaux de contamination des différents types de tissus et la *Quantitative Whole-Body Autoradiography* (QWBA) a permis de localiser les nanoplastiques *in vivo*.<sup>152</sup> Les *Placopecten amagellanicus* ont également été étudiés avec une méthodologie similaire, pour évaluer une éventuelle translocation des nanoplastiques.<sup>153</sup>

En comparaison aux isotopes radioactifs, les isotopes stables sont plus faciles à manipuler, puisqu'ils n'émettent pas de radioactivité et ne nécessitent donc pas d'installation particulière.<sup>14</sup> Avec des masses généralement plus proches des isotopes initiaux que les isotopes radioactifs, la méthode de marquage aux isotopes stables est celle qui permet de s'approcher au plus près de l'objet non marqué, en termes de composition chimique, de densité, etc. et donc de comportement et toxicité, tout en facilitant sa détection. Les isotopes stables peuvent être analysés avec différentes

techniques couramment retrouvées dans les laboratoires telles que la spectrométrie de masse à ratio isotopique (IRMS) ou la pyrolyse–chromatographie en phase gazeuse–spectrométrie de masse (Py-GC/MS), ces deux techniques permettant d'accéder à des concentrations à des niveaux de traces.

Malgré ces nombreux avantages, le marquage aux isotopes stables n'a été utilisé que dans quelques études, la plupart portant sur la biodégradation de macroplastiques.<sup>14</sup> Une seule étude reporte avoir eu recours à cette technique pour marquer des nanoplastiques modèles. Dans leurs travaux, Murazzi *et al.* ont synthétisé par une méthode ascendante (*bottom-up*) des nanoplastiques de polystyrène marqués au carbone <sup>13</sup>C, d'environ 30 nm de diamètre, avec du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>8</sub> et des tensioactifs (dodécylsulfate de sodium ou en anglais *sodium dodecyl sulfate*, SDS).<sup>154</sup> Ils les ont ensuite utilisés pour étudier leur transport dans des jeunes arbres. Pour cela, les différentes parties des plantes (racines, tige, feuilles) ont été analysées par EA-IRMS et les signatures isotopiques des échantillons exposés ont été comparés aux échantillons témoins.<sup>154</sup> Ces travaux montrent le potentiel du marquage au carbone <sup>13</sup>C pour faciliter le suivi de nanoplastiques. Cependant, quelques réserves peuvent être émises quant à la méthode de synthèse (avec tensioactifs) ou à la méthode de calcul des concentrations en nanoplastiques (*cf.* Chapitre 3 partie I. 1. 4. 2. ).

Le faible nombre de publications mettant en œuvre des micro-ou des nanoplastiques marqués avec des isotopes stables, pourrait s'expliquer par le fait que, à notre connaissance, de tels matériaux modèles ne sont pas disponibles commercialement, ils doivent donc être synthétisés en laboratoire avec des matières premières coûteuses et être soigneusement caractérisés pour être pertinents. Une approche multidisciplinaire nécessite d'être mise en place.

### IV. 5. Bilan

L'analyse de ces travaux sur l'utilisation de nanoplastiques modèles marqués permet de dégager quelques caractéristiques essentielles à considérer en termes de qualité du marquage :

- Le marqueur peut être lié ou non par covalence à la matrice polymère mais sa lixiviation ne doit pas être possible. Cette contrainte limite fortement l'ajout de marqueurs par simple adsorption.
- Le marquage ne doit pas modifier les propriétés physico-chimiques globales et de surface des nanoplastiques. L'incorporation d'éléments lourds comme des métaux ou des lanthanides, doit être ajustée pour que la modification de la densité des particules soit négligeable.
- Les propriétés du marqueur ne doivent pas impacter la toxicité des nanoplastiques, ce qui limite par exemple l'utilisation d'isotopes radioactifs et la présence de marqueurs toxiques en surface des particules.
- Le marqueur doit être quantifiable au seuil de détection le plus faible possible, soit en nombre, soit en masse, tout en minimisant les interférences avec les matrices environnementales.

### Conclusion

Les nanoplastiques représentent un risque pour l'environnement et le vivant, du fait de leur probable ubiquité et de leur taille qui leur permet potentiellement de traverser certaines barrières biologiques pouvant induire de la toxicité dans les organismes, directement ou en transportant d'autres contaminants. Il est donc important de comprendre les comportements de ces nanoplastiques, en particulier de leurs interactions avec le vivant. La quantification et la collecte des nanoplastiques dans des échantillons environnementaux restant encore un défi, l'utilisation de nanoplastiques modèles marqués permet d'étudier leur comportement lors d'expériences réalisées en laboratoire, tout en facilitant leur quantification dans des milieux complexes comme des organismes. Parmi les différents marqueurs possibles, le marquage à l'aide d'isotopes stables apparaît comme une solution pour s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, sans risque de désorption du marqueur comme pour d'autres types de marquages. Enfin, l'élaboration des nanoplastiques en laboratoire permet un contrôle de leurs propriétés et de leur composition.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse était tout d'abord d'élaborer des nanoplastiques marqués avec des isotopes stables (**Chapitre 2**), puis de développer les méthodes analytiques permettant leur quantification en présence de matrices complexes (**Chapitre 3**), afin d'étudier leur accumulation et leur toxicité vis-à-vis des deux crustacés planctoniques *Daphnia magna* et *Artemia sp.* (**Chapitre 4**).





---

CHAPITRE 2. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE  
NANOPLASTIQUES MODÈLES MARQUÉS À L'ISOTOPIE

---

## **CHAPITRE 2. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NANOPLASTIQUES MODÈLES MARQUÉS À L'ISOTOPIE 55**

<b>Introduction</b> .....	<b>57</b>
<b>I. Synthèse bibliographique : la polymérisation par émulsion.</b> .....	<b>58</b>
I. 1. La polymérisation par émulsion avec tensioactifs .....	58
I. 2. La polymérisation par émulsion sans tensioactif .....	59
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	<b>62</b>
II. 1. Matériels .....	62
II. 2. Méthodes .....	62
<b>III. Synthèse des nanoplastiques marqués à l'isotopie</b> .....	<b>66</b>
III. 1. Stratégie de synthèse .....	66
III. 2. Nanoplastiques marqués au deutérium .....	67
III. 3. Nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup> C .....	71
III. 4. Effets isotopiques .....	73
<b>IV. Caractérisation des nanoplastiques marqués</b> .....	<b>77</b>
IV. 1. Détermination de la fraction de polyacrylique par RMN .....	77
IV. 2. Titration des groupements carboxyles à la surface des nanoplastiques .....	79
IV. 3. Stabilité .....	82
<b>Conclusion</b> .....	<b>83</b>

## Introduction

Les protocoles de prélèvements de nanoplastiques environnementaux et leur quantification restent encore à développer, l'utilisation de nanoplastiques modèles est toujours incontournable pour leur étude en laboratoire. Les nanoparticules modèles, commerciales ou synthétisées en laboratoire, sont choisies à la place des débris plastiques naturels pour à la fois, connaître le comportement physico-chimique de ces derniers, estimer les risques qu'ils représentent et mettre au point des méthodes analytiques qui permettront d'étudier les échantillons environnementaux.

Pour faciliter la détection et le suivi des échantillons modèles, il existe plusieurs types de marquage, tels que métalliques, fluorescents ou isotopiques. Cependant, l'utilisation de métaux ou de fluorophores peut entraîner une modification des propriétés des particules, comme leur densité, ou encore engendrer une toxicité supplémentaire et des erreurs d'interprétation, si les fluorophores se désorbent, par exemple.<sup>133,155</sup> Le marquage isotopique, à l'aide d'isotopes stables, apparaît alors comme une solution pour s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, que ce soit en termes de nature du polymère, ou des propriétés chimique et physique (densité) des nanoplastiques.<sup>156</sup>

Dans le chapitre bibliographique de ce manuscrit, nous avons vu qu'il existait plusieurs méthodes pour élaborer des nanoplastiques modèles.<sup>98</sup> Les nanoplastiques obtenus par la dégradation de macroplastiques (méthode descendante) sont polymorphiques et polydisperses, alors que la synthèse par polymérisation à partir de monomère (méthode ascendante) permet d'obtenir des particules sphériques de taille contrôlée, et des propriétés (composition, surface, forme, taille, etc.) ajustables et homogènes sur l'ensemble des nanoplastiques synthétisés. Dans cette idée, mais en cherchant toujours à se rapprocher des nanoplastiques environnementaux, Pessoni *et al.* ont proposé une méthode pour synthétiser des nanoplastiques modèles chargés négativement par des groupements carboxyles en surface, imitant l'oxydation des plastiques vieillissant dans la nature.<sup>107</sup> De plus, la polymérisation est effectuée sans tensioactif, ni additifs de synthèse ou post-synthèse (antibactériens), substances souvent utilisées lors de l'élaboration de nanoparticules qui peuvent modifier leurs propriétés physico-chimiques et leur toxicité.<sup>87,88</sup>

L'objectif de ce chapitre est d'adapter la méthode de polymérisation développée par Pessoni *et al.*<sup>107</sup> afin de synthétiser sans tensioactif ni additif, des nanoplastiques modèles marqués au deutérium ou au carbone <sup>13</sup>C, chargés négativement par des groupements carboxyles à leur surface.

Ce chapitre est développé en plusieurs parties. Dans un premier temps, la synthèse des nanoplastiques modèles avec plusieurs taux d'enrichissement est présentée à partir de différents monomères marqués à l'isotopie. La taille, charge de surface (potentiel zéta), la forme et la rugosité de surface des nanoplastiques ont été caractérisées et les effets isotopiques observés lors de ces synthèses sont discutés.

Dans un deuxième temps, des caractérisations complémentaires effectuées sur certains nanoplastiques modèles sont reportées : la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) pour déterminer la fraction de poly(acide acrylique), une titration des groupements carboxyles présents à la surface des nanoplastiques ou encore l'évaluation de la stabilité des nanoplastiques modèles par suivi de leur agrégation dans les milieux d'intérêt.



## I. Synthèse bibliographique : la polymérisation par émulsion.

### I. 1. La polymérisation par émulsion avec tensioactifs

Parmi les techniques permettant de synthétiser des nanoparticules de polymère, une technique très courante est la polymérisation par émulsion en phase dispersée aqueuse en présence de tensioactifs.<sup>98</sup> Cette méthode de polymérisation consiste à disperser un monomère très peu soluble dans l'eau. Les gouttelettes de monomères de cette émulsion sont stabilisées par des tensioactifs. La réaction de polymérisation radicalaire est déclenchée par l'amorceur hydrosoluble, qui réagit avec la faible fraction de monomère dissoute dans la phase aqueuse. Les sites formés, stabilisés par les tensioactifs, continuent leur croissance grâce à la diffusion du monomère depuis les réservoirs (gouttelettes) vers les sites de polymérisation jusqu'à l'épuisement des réservoirs, moment à partir duquel tout le monomère aura été converti en polymère. Les concentrations et la nature des réactifs influencent la taille des particules finales. Par exemple, les tensioactifs ioniques, qui mettent en jeu des interactions électrostatiques, permettent généralement la production de particules plus petites que les tensioactifs non ioniques qui stabilisent les particules par effet stérique.

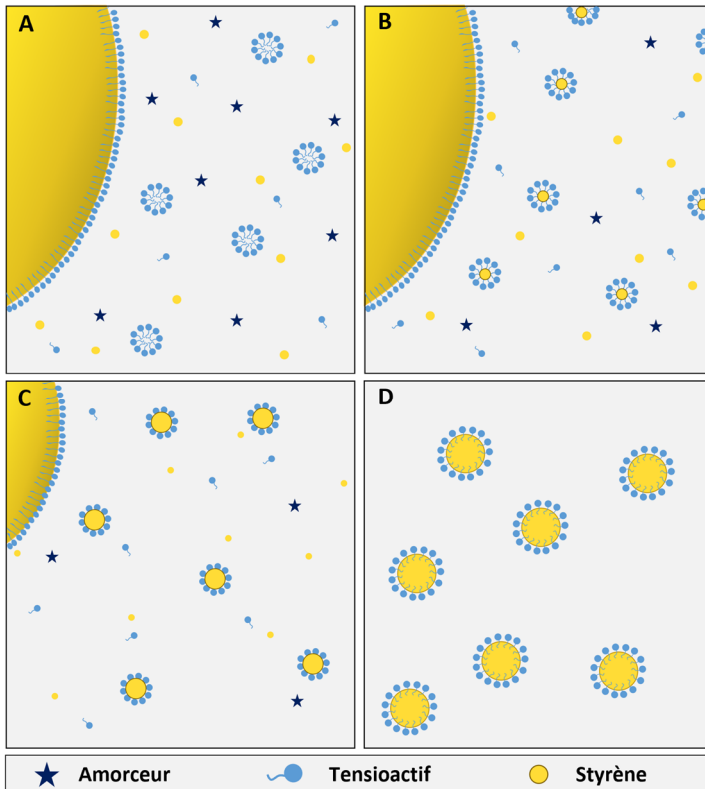


Figure 2.1: Principe général de la polymérisation en émulsion avec tensioactifs, avec en jaune le monomère hydrophobe (styrène), en bleu les tensioactifs, et sous forme d'étoile l'amorceur hydrosoluble. A : Premiers instants, B : Début de la polymérisation, C : Croissance des particules, D : fin de la réaction de polymérisation à conversion totale.

Cette technique est très utilisée car elle a de nombreux avantages. Tout d'abord, la synthèse est réalisée dans l'eau, ce qui permet d'éviter d'utiliser (et de purifier, après synthèses) des solvants

toxiques. L'eau permet également d'avoir une très bonne dissipation de la température et une viscosité faible. Enfin, les propriétés des émulsions rendent le procédé plus contrôlable.<sup>98,157</sup>

Cependant, comme mentionné dans le chapitre bibliographique, pour une utilisation des nanoparticules en tant que nanoplastiques modèles, la synthèse avec tensioactifs est à éviter puisque ces derniers vont modifier les propriétés physico-chimiques des nanoplastiques et éventuellement apporter une toxicité ne dépendant pas des nanoplastiques eux-mêmes.<sup>88</sup> L'élimination des tensioactifs après la synthèse, en plus de ne pas être totalement efficace, peut entraîner des problèmes de stabilité des nanoplastiques modèles, qui vont avoir tendance à s'agréger et sédimenter. Une alternative possible est la polymérisation sans tensioactif.

### I. 2. La polymérisation par émulsion sans tensioactif

La méthode de polymérisation par émulsion sans tensioactif repose sur le même principe que la polymérisation en émulsion simple, c'est-à-dire sur une émulsion de monomère hydrophobe en milieu dispersé aqueux mais en lieu et place du tensioactif, c'est un monomère hydrophile qui est ajouté dans le mélange réactionnel.

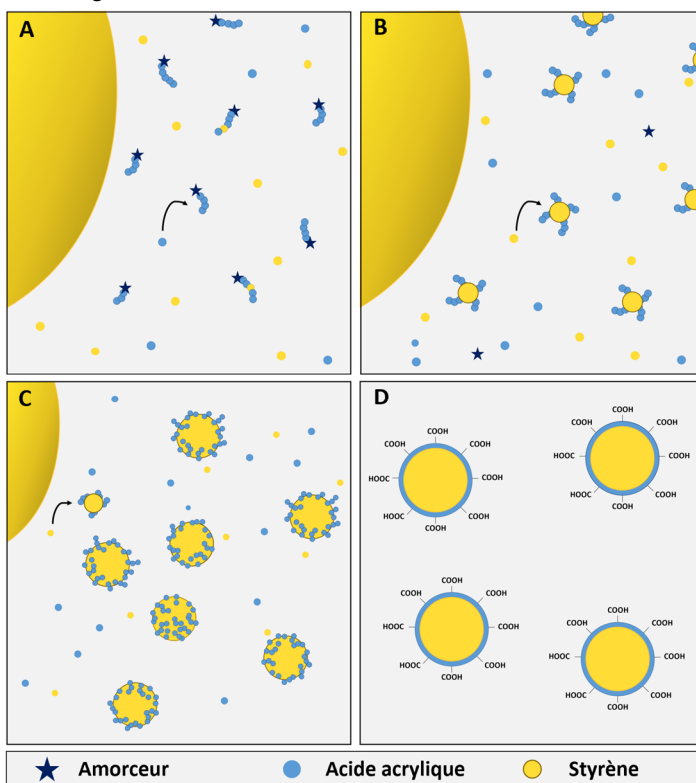


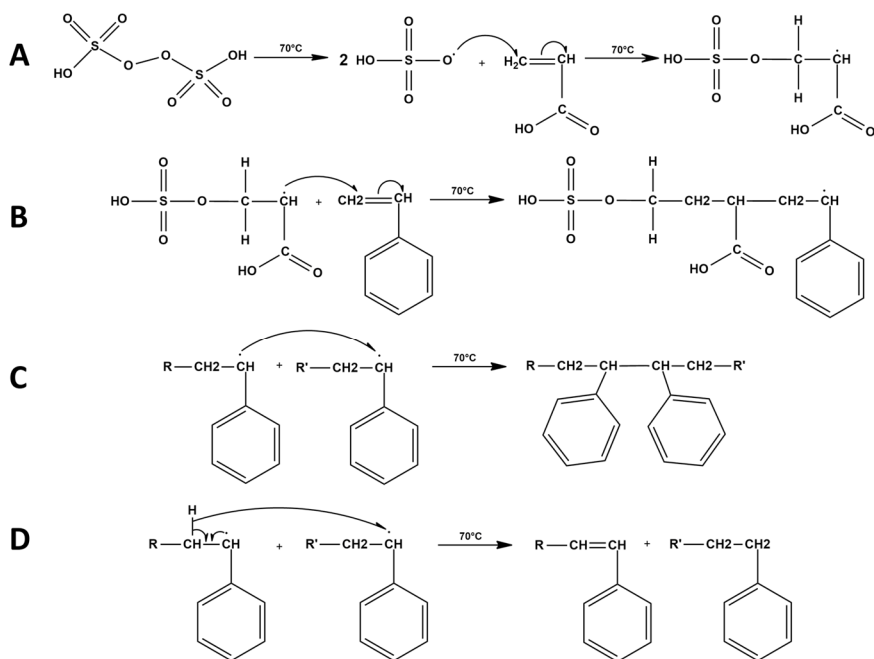
Figure 2.2: Principe général de la polymérisation en émulsion sans tensioactif, avec en jaune le monomère hydrophobe (styrène), en bleu le comonomère hydrosoluble et sous forme d'étoile, l'amorceur hydrosoluble. A : Premiers instants, B : Début de la polymérisation, C : Croissance des particules, D : fin de la réaction de polymérisation à conversion totale.

Cette technique de polymérisation est réalisée en milieu aqueux, en présence d'amorceur hydrosoluble, d'un monomère principal hydrophobe, et d'un comonomère minoritaire

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

hydrosoluble, qui donnera la fonctionnalité de surface aux particules finales. La polymérisation se décompose en plusieurs étapes, présentées dans la Figure 2.2. Tout d'abord, l'amorceur hydrosoluble (ammonium persulfate, APS) amorce la réaction de polymérisation en phase aqueuse, ce sont donc les monomères présents à proximité qui sont polymérisés i.e. l'acide acrylique et un faible pourcentage de styrène venant de la fraction soluble en phase aqueuse (étape A). A un certain stade d'avancement de la polymérisation, les oligomères ainsi créés vont atteindre une longueur critique, à partir de laquelle ils ne sont plus solubles en phase aqueuse et s'agglomèrent (étape de nucléation) pour former des nanoparticules, sites de la réaction de polymérisation. Elles sont stabilisées par les chaînes de poly(acide acrylique) présentes à leur surface et poursuivent leur croissance par migration du styrène depuis les réservoirs (étapes B et C), jusqu'à conversion totale du styrène (étape D).<sup>158</sup> Les particules finales sont composées de copolymères poly(styrène-co-acide acrylique) contenant majoritairement des unités styréniques .

A l'échelle moléculaire, les étapes présentées précédemment sont régies par les mécanismes réactionnels de la polymérisation radicalaire présentés dans la Figure 2.3.



**Figure 2.3:** Exemple de mécanisme réactionnel de la polymérisation radicalaire dans le cas de la copolymérisation de styrène et d'acide acrylique avec les différentes étapes : amorçage sur l'acide acrylique (A), propagation sur le styrène (B) et terminaison entre deux oligomères de polystyrène par combinaison (C) ou dismutation (D).

Cette méthode de polymérisation a été utilisée par Pessoni *et al.* et les propriétés des particules obtenues permettent de les considérer comme des nanoplastiques modèles, fonctionnalisés en leur surface par des groupements carboxyles qui miment l'oxydation de surface des plastiques vieilliss dans l'environnement.<sup>107</sup> Leur morphologie de surface est ajustable en fonction de la quantité d'acide acrylique mis en jeu dans la synthèse, ainsi un faible taux d'acide acrylique donne des

nanoplastiques à la surface lisse, tandis qu'un fort taux d'acide acrylique permet d'obtenir des nanoplastiques à la surface rugueuse de type « framboise » (cf. Figure 2.4, image à la conversion  $\chi_8$ ).<sup>107</sup>

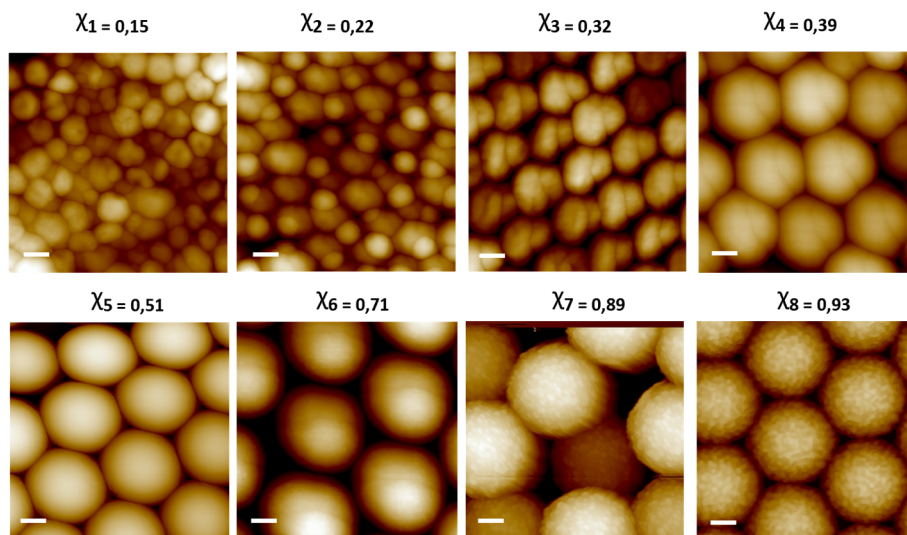


Figure 2.4: Evolution de la structure des particules en fonction de la conversion ( $\chi$ ) observée par AFM avec une barre d'échelle de 100 nm. Issu de Aynard, 2022.<sup>85</sup>

Les mécanismes de la polymérisation par émulsion sans tensioactif ont été étudiés plus précisément lors d'une précédente thèse.<sup>85</sup> Il a été montré que l'incorporation du polyacrylique se faisait en deux temps (cf. Figure 2.5). Dans un premier temps, les nanoplastiques sont majoritairement composés de polyacrylique puisque c'est la polymérisation de l'acide acrylique qui initie la formation des nanoparticules. Lors de la croissance des particules, la fraction de polystyrène devient majoritaire. En fin de réaction, l'acide acrylique est à nouveau incorporé à la surface des nanoplastiques, leur donnant, si une grande quantité d'acide acrylique est mise en jeu, une morphologie de type « framboise », comme présenté dans la Figure 2.5 (image à la conversion  $\chi_8$ ).

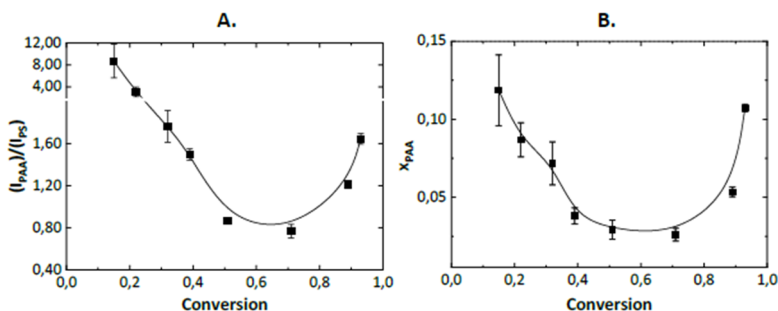


Figure 2.5 Evolution de la fraction de polyacrylique en fonction de la conversion ( $\chi$ ) en polymère d'un échantillon de type NP<sup>12</sup>C avec 18% d'acide acrylique. Résultats obtenus par suivi FTIR (A) et par RMN (B), issu de Aynard, 2022.<sup>85</sup>

## II. Matériels et méthodes

### II. 1. Matériels

Pour les synthèses, le styrène ( $S$ ,  $\geq 99\%$ , stabilisant : entre 30 et 50 ppm de 4-tert-butylpyrocatechol), le styrène- $(^2H)_8$  ( $\geq 98\%$  atomique de  $^2H$ , stabilisant :  $\leq 100$  ppm de 4-tert-butylpyrocatechol), le styrène- $(^2H)_5$  ( $\geq 98\%$  atomique de  $^2H$ , stabilisant : hydroquinone, quantité inconnue), le styrène- $(^{13}C)_\beta$  ( $\geq 99\%$  atomique de  $^{13}C$ , stabilisant :  $\leq 10$  ppm de 4-tert-butylpyrocatechol), le styrène- $(^{13}C)_6$  ( $\geq 99\%$  atomique de  $^{13}C$ , stabilisant : 4-tert-butylpyrocatechol, quantité inconnue), l'acide acrylique (AA, 97%), le persulfate d'ammonium (APS,  $\geq 99\%$ ) et le tensioactif nonylphénol avec 40 unités d'éthoxylate (Tergitol™ NP40) ont été fournis par Sigma Aldrich. Pour les titrations, l'hydroxyde de sodium (NaOH), le chlorure de nickel et le tampon HEPES ont également été fournis par Sigma Aldrich et le pyrocatechol violet a été fourni par Alfa Aesar.

Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification particulière. L'eau ultrapure utilisée pour les synthèses, les dilutions et autres préparations d'échantillons, a été fournie par un système de purification d'eau Millipore (Merck, Darmstadt, Germany), avec une filtration à  $0,22\ \mu\text{m}$  et une résistivité de  $18,2\ \text{M}\Omega\ \text{cm}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ .

### II. 2. Méthodes

#### II. 2. 1. Synthèse

##### II. 2. 1. 1. Polymérisation sans tensioactif

Le protocole de synthèse des nanoplastiques sans tensioactif a été adapté à partir de la méthode développée par Pessoni et al.<sup>107</sup> Compte tenu du coût élevé des monomères enrichis, des ajustements ont dû être faits pour que cette polymérisation soit réalisable en faible quantité.

Bien qu'il y ait de légères variations en fonction de la proportion de monomère enrichi utilisée et de leur masse volumique (cf. Tableau 2.1), le protocole de synthèse d'un nanoplastique formé à partir d'un mélange réactionnel composé de 18% molaire d'acide acrylique et pour 82% molaire de styrène (en négligeant la masse d'amorceur) peut être décrit de la manière suivante.

Dans un ballon bicol de 50 mL, équipé d'un barreau aimanté, 14 mL d'eau ultrapure, et 92  $\mu\text{L}$  (1,3 mmol) d'acide acrylique sont ajoutés et dégazés par bullage d'azote pendant 15 min. Le styrène enrichi (0%, 11%, 50% ou 100% du styrène total) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, à l'aide d'une seringue en verre de 1 mL ou 100  $\mu\text{L}$ , en fonction de la quantité ajoutée (0,77  $\mu\text{L}$ , 350  $\mu\text{L}$ , 700  $\mu\text{L}$ ), suivi du styrène non enrichi préalablement dégazé par bullage d'azote pendant 15 min pour obtenir 700  $\mu\text{L}$  de styrène au total. Après cet ajout, le mélange est agité vigoureusement pour former l'émulsion (stabilisation par agitation à 800 rpm). Le ballon est ensuite plongé dans un bain thermostaté à  $70^\circ\text{C}$ . Après stabilisation de la température, 1 mL de solution d'APS (17,9  $\mu\text{g}$  d'APS dissous dans 5 mL d'eau ultrapure), préalablement dégazée par bullage d'azote pendant 15 min, est ajouté à l'aide d'une seringue dans le milieu réactionnel sous agitation. Après 10 h de réaction, la température est abaissée jusqu'à température ambiante et le mélange réactionnel est filtré sur gaze pour enlever les gros agrégats. Le filtrat contenant les nanoplastiques est ensuite purifié par 5 cycles de centrifugation (Beckman Avanti J-30I) à des vitesses de rotation comprises entre 15000 et 22500 rpm (en fonction de la taille des particules), pendant 30 min. Après chaque centrifugation, le surnageant est remplacé, à volume égal, par de l'eau ultrapure et redispersé. Après 5 cycles de centrifugation/redispersion, la conductivité du dernier surnageant est inférieure à  $10\ \mu\text{S}\ \text{cm}^{-1}$ .

### II. 2. 1. 2. Polymérisation avec tensioactif

Le protocole de synthèse avec tensioactif des nanoplastiques formés à partir d'un mélange réactionnel composé de 94% massique de styrène et 6% massique de tensioactif non ionique (en négligeant la masse d'amorceur) peut être décrit de la manière suivante.

Dans un ballon bicol de 50 mL, préalablement équipé d'un barreau aimanté, 5,8 mL d'eau ultrapure, et 58 µg de tensioactif non ionique (nonylphénol avec 40 unités d'éthoxylate, le Tergitol™ NP40) sont ajoutés et dégazés par bullage d'azote pendant 15 min. Un volume de 700 µL de styrène enrichi est ensuite ajouté dans le ballon, à l'aide d'une seringue en verre de 1 mL. Le mélange est ensuite agité à 800 rpm pour former et stabiliser l'émulsion puis le ballon est plongé dans un bain thermostaté à 70°C. Après stabilisation de la température, 1 mL de solution d'APS (70 µg d'APS dissous dans 5 mL d'eau ultrapure), préalablement dégazée par bullage d'azote pendant 15 min, est ajouté à l'aide d'une seringue dans le milieu réactionnel sous agitation. Après 10 h de réaction, la température est abaissée jusqu'à température ambiante et le mélange réactionnel est filtré sur gaze pour enlever les gros agrégats. Le filtrat contenant les nanoplastiques est ensuite purifié par 5 cycles de centrifugation (Beckman Avanti J-30I) à une vitesse de rotation de 21000 rpm, pendant 30 min. Après chaque centrifugation, le surnageant est remplacé, à volume égal, par de l'eau ultrapure et redispersé. Après 5 cycles de centrifugation/redispersion, la conductivité du dernier surnageant est inférieure à 10 µS cm<sup>-1</sup>.

### II. 2. 1. 3. Taux de conversion

Les taux de conversion en polymère, en agrégats et en nanoparticules non agrégées ont été calculés avec les équations 2.1, 2.2 et 2.3, respectivement.

$$X_{total} = \frac{m_{NP} + m_{agrégats}}{m_S + m_{Se} + m_{Ac}} \quad 2.1$$

Avec :

- $X_{total}$  : conversion totale en polymère
- $m_{NP}$  : masse de nanoparticules non agrégées
- $m_{agrégats}$  : masse d'agrégats
- $m_S, m_{Se}, m_{Ac}$  : masse de styrène, styrène enrichi et acide acrylique, respectivement

$$X_{agrégats} = \frac{m_{agrégats}}{m_S + m_{Se} + m_{Ac}} \quad 2.2$$

Avec :

- $X_{agrégats}$  : conversion en agrégats
- $m_{agrégats}$  : masse d'agrégats
- $m_S, m_{Se}, m_{Ac}$  : masse de styrène, styrène enrichi et acide acrylique, respectivement

$$X_{particules} = \frac{m_{NP}}{m_S + m_{Se} + m_{Ac}} \quad 2.3$$

Avec :

- $X_{particules}$  : conversion en particules non agrégées
- $m_{NP}$  : masse de nanoplastiques
- $m_S, m_{Se}, m_{Ac}$  : masse de styrène, styrène enrichi et acide acrylique, respectivement

## II. 2. 2. Caractérisations

### II. 2. 2. 1. DLS

Le diamètre hydrodynamique des nanoplastiques (diamètre Z-Average) et leur dispersité (Indice de Polydispersité PDI) ont été mesurés avec le Nano-ZS zetasizer (modèle ZEN3600 de Malvern Instruments) équipé d'un laser He-Ne de 4 mV, avec  $\lambda = 632$  nm et un angle de diffusion  $173^\circ$ .

### II. 2. 2. 2. Potentiel zéta

Le potentiel zéta des nanoplastiques a été mesuré avec le ZetaSizer Nano Series ZEN3600, (Malvern Instruments), à l'aide du modèle de Smoluchowski. Pour cela, une dispersion à 10 ppm de nanoplastiques a été préparée dans une solution de tampon phosphate (1 mM, pH 7).

### II. 2. 2. 3. Imagerie

La microscopie de force atomique (AFM) a été réalisée avec un microscope MultiMode 8-HR (Bruker) en mode « peakForce tapping ». Pour cela, environ 50  $\mu$ L de dispersion de nanoplastiques (après purification  $C \approx 30\,000$  ppm) ont été déposés sur un wafer de silicium et étalés par centrifugation (à 2000 RPM pendant 2 min) pour former un film mince. Les images ont été réalisées avec une fenêtre de 500 nm de côté avec 256 pixels par ligne et un paramètre Scan rate de 0,977 Hz.

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée avec un microscope Apreo 2S (Thermofisher) avec un détecteur d'électron secondaire (T : détecteur dans la colonne, ETD : détecteur dans la chambre) à une tension de 2 kV. Pour cela, environ 2  $\mu$ L de dispersion de nanoplastiques ( $C \approx 3000$  ppm) ont été déposés et séchés sur une grille. Les nanoplastiques ont ensuite été métallisés par 4 nm de platine puis placés dans la chambre à vide du microscope, avant analyse.

### II. 2. 2. 4. Py-GC/MS

Les analyses par Py-GC/MS ont été faites en mode SCAN, selon les conditions décrites dans le Chapitre 3.

### II. 2. 2. 5. RMN

Les spectres RMN du proton ( $^1\text{H}$ ) sont réalisés avec un spectromètre Bruker 400MHz à  $25^\circ\text{C}$  en répétant 32 scans avec un temps de relaxation de 5 s entre chaque scan. Pour cela, les particules séchées par lyophilisation (5-10 mg) ont été solubilisées dans une solution (0,6 mL) de  $\text{CDCl}_3$  /  $\text{DMSO-d}_6$  (50/50 vol.%). Les spectres sont traités avec le logiciel TopSpin® 4.1.

### II. 2. 2. 6. Titration des COOH

#### II. 2. 2. 6. 1. Titration potentiométrique

La titration acido-basique des COOH des  $\text{NP}_{\text{Nat}}$  a été réalisée à l'aide d'un Titrand 888 (Metrohm) équipé d'un agitateur magnétique et d'une sonde pH métrique, sur 20 mL de solution de nanoplastiques concentrés à 500 ppm. Le titrage étant fait en retour, une quantité connue de NaOH (100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a été ajoutée pour obtenir un pH supérieur à 11. La dispersion est ensuite titrée avec une solution de HCl ( $C_{\text{HCl}} = 5$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Deux sauts de pH sont observés, un correspondant à la titration de l'excès de NaOH et l'autre aux groupements carboxyles présents à la surface des nanoplastiques.

#### II. 2. 2. 6. 2. Titration par suivi d'un complexe en spectrométrie UV-visible

La titration des groupements fonctionnels carboxyles a été réalisée à partir de la méthode développée par Hennig *et al.* reposant sur le suivi d'un complexe en spectrométrie UV-visible (complexe formé par les ions Ni<sup>2+</sup> et le pyrocatechol violet (PV)).<sup>159</sup> Les spectres UV-Visible ont été obtenus avec un appareil UV-2450 (Shimadzu) en utilisant le mode spectre, avec un pas de mesure de 1 nm, pour les longueurs d'onde entre 300 et 800 nm. Les mesures ont été réalisées dans du tampon HEPES (10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,5) dans une cuve en PMMA avec un trajet optique de 1 cm. Une mesure de la ligne de base a été réalisée avec le tampon HEPES et soustraite de chaque mesure.

Pour quantifier les groupes fonctionnels carboxyles, différentes quantités de nanoplastiques (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 et 500 µL de dispersion de nanoplastiques à 2000 ppm) sont mises en contact pendant 10 minutes avec une quantité fixe d'ions Ni<sup>2+</sup> (100 µL de solution à C<sub>NiCl2</sub> = 1,2 mmol.L<sup>-1</sup> diluée dans du tampon HEPES), pour un volume total de 600 µL. Une solution sans nickel est aussi préparée, avec 500 µL de dispersion de NP et 100 µL de tampon HEPES, afin d'avoir le blanc des nanoplastiques seuls (permettant d'obtenir l'absorbance du pyrocatechol violet en absence de nickel).

Après centrifugation pendant 30 minutes à 14 000 rpm, 450 µL du surnageant sont prélevés et mélangés, directement dans la cuve UV en PMMA, avec 450 µL de solution de pyrocatechol violet (PV) à 0,08 mmol L<sup>-1</sup> (préparée le jour même avec du tampon HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,5), afin d'obtenir une concentration finale de 0,04 mmol.L<sup>-1</sup>. L'acquisition du spectre d'absorbance UV-visible est réalisée 45 secondes après avoir fait le mélange, afin d'en extraire l'absorbance à 614 nm corrigée par celle à 800 nm ( $A_{614 \text{ corr}} = A_{614} - A_{800}$ ). La représentation de cette absorbance corrigée en fonction du volume de dispersion de nanoplastiques permet d'obtenir une régression linéaire de la forme  $A_{614 \text{ corr}} = a \cdot V_{NP} + b$ , ainsi que l'absorption du PV en absence de nickel, qui permettent de remonter à la quantité de groupements carboxyles, grâce à l'équation 2.4 :

$$C_{COOH} (\mu\text{mol/g}) = \frac{n * C_{Ni} * V_{tot} * a}{C_{NP} * (A_{PV} - b)} \quad 2.4$$

Avec :

- C<sub>COOH</sub> : concentration des COOH en µmol/g
- n : facteur stœchiométrique indiquant le nombre de COOH liés par atomes de cations déterminé comme étant égal à 2,65 ± 0,12.<sup>159</sup>
- C<sub>Ni</sub> : 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>
- V<sub>tot</sub> : 600 µL
- a : pente de la régression linéaire
- C<sub>NP</sub> : 2 g.L<sup>-1</sup>
- A<sub>PV</sub> : absorbance du PV en absence de Ni<sup>2+</sup>
- b : ordonnée à l'origine de la régression linéaire



## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

La densité des groupements carboxyles peut aussi être calculée, à l'aide de l'équation 2.5.

$$C_{COOH} (\#/nm^2) = C_{COOH} (\mu mol/g) * \frac{\rho * \frac{4}{3} \pi * \left(\frac{D * 10^{-7}}{2}\right)^3 * Na * 10^{-6}}{4 \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^2} \quad 2.5$$

Avec :

- $C_{COOH}$  : concentration des COOH
- $\rho$  : masse volumique du polystyrène ( $g \cdot mL^{-1}$ ), considéré comme égale à  $1,05 \text{ g} \cdot mL^{-1}$
- $D$  : diamètre des particules (nm)
- $Na$  :  $6,02 * 10^{23} \#/mol$

### III. Synthèse des nanoplastiques marqués à l'isotopie

#### III. 1. Stratégie de synthèse

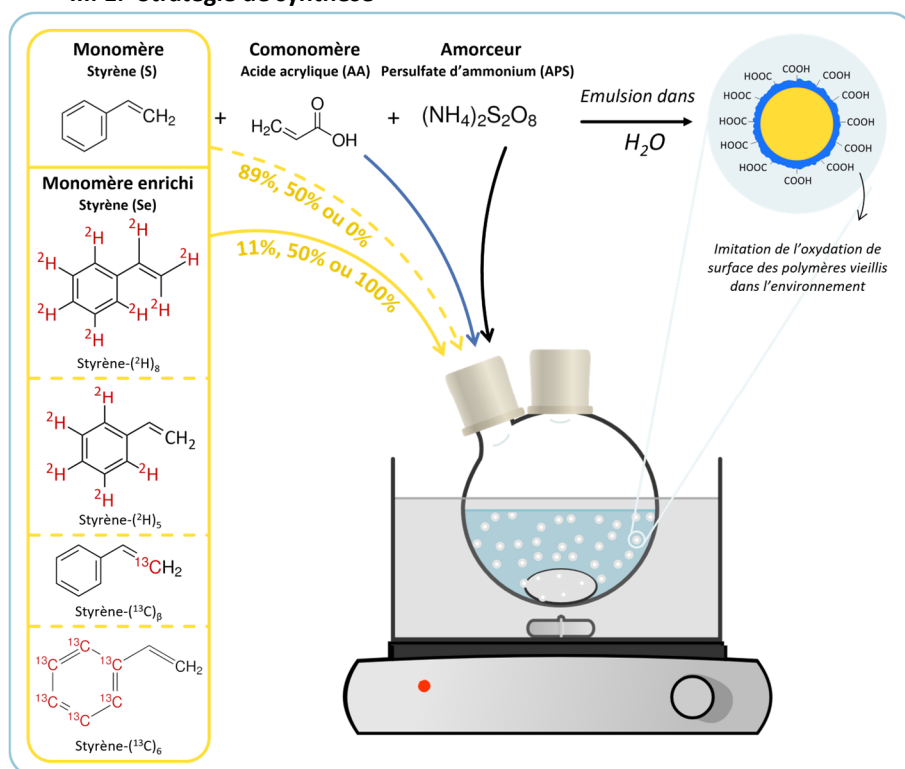


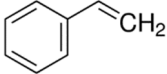
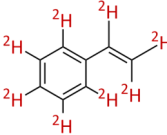
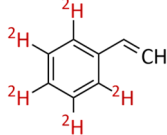
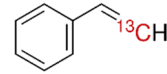
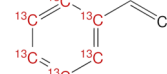
Figure 2.6: Schéma présentant la stratégie de synthèse.

Dans ce chapitre, l'objectif est de préparer des nanoplastiques marqués isotopiquement en adaptant la méthode décrite par Pessoni *et al.*, c'est-à-dire en faisant une polymérisation par émulsion sans tensioactif en phase aqueuse.<sup>107</sup> Cette technique de polymérisation est donc réalisée en milieu aqueux, en présence d'amorceur hydrosoluble (ici le persulfate d'ammonium : APS), d'un monomère principal hydrophobe (ici le styrène : S), et d'un comonomère hydrophile (ici l'acide acrylique : AA), qui donne la fonctionnalité de surface à la particule et assure sa stabilité.

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotope

Les nanoplastiques ont été marqués de façon covalente au sein de la chaîne macromoléculaire par des atomes de deutérium ou au carbone  $^{13}\text{C}$  en utilisant des monomères marqués (styrène enrichi : Se) présentés dans la Tableau 2.1. Le marquage au deutérium a été testé avec 2 monomères différents : un monomère enrichi notamment sur la double liaison (groupement vinyle), le styrène- $(^2\text{H})_8$  enrichi avec 8 atomes de deutérium et monomère enrichi uniquement sur le cycle aromatique, le styrène- $(^2\text{H})_5$  enrichi avec 5 atomes de deutérium. Pour le marquage au carbone  $^{13}\text{C}$ , le styrène- $(^{13}\text{C})_\beta$ , enrichi avec un carbone  $^{13}\text{C}$  en position  $\beta$  (sur le groupement vinyle), et le styrène- $(^{13}\text{C})_6$  enrichi avec 6 atomes de carbone  $^{13}\text{C}$  (uniquement sur le cycle aromatique) ont été utilisés.

**Tableau 2.1:** Noms, formules chimiques, masses molaires (M) en g/mol et masses volumiques (g/mL) des monomères utilisés.

Styrène (S)	Styrène- $(^2\text{H})_8$	Styrène- $(^2\text{H})_5$	Styrène- $(^{13}\text{C})_\beta$	Styrène- $(^{13}\text{C})_6$
				
M = 104,2 g/mol	M = 112,2 g/mol	M = 109,2 g/mol	M = 105,1 g/mol	M = 110,1 g/mol
$\rho = 0,906$ g/mL	$\rho = 0,979$ g/mL	$\rho = 0,952$ g/mL	$\rho = 0,918$ g/mL	$\rho = 0,961$ g/mL
I : TBC	I : TBC	I : hydroquinone	I : TBC	I : TBC
Ci : [30 ; 50] ppm	$\leq 100$ ppm	Ci : inconnue	$\leq 10$ ppm	Ci : inconnue

Avec I : Inhibiteur et TBC : 4-tert-butylpyrocatechol

En raison du coût important des monomères enrichis (entre 200 et 3000 fois plus que le styrène non enrichi), plusieurs modifications du protocole de base ont dû être mises en place pour que ce procédé soit réalisable à de faibles quantités. Le volume total de la polymérisation a été fortement diminué (de 100 mL à 15 mL). La préparation et le mode d'introduction du styrène ont été modifiés (le styrène enrichi est ajouté avec une seringue en verre en très faible quantité, et n'est pas dégazé).

Dans la suite de ces travaux, les nanoplastiques synthétisés seront appelés selon une notation spécifique rendant compte de l'enrichissement du monomère marqué utilisé et du pourcentage de monomère enrichi par rapport au styrène total mis en jeu dans la synthèse de la façon suivante : **NP-(X)<sub>Y</sub>-Z%**, avec X =  $^2\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ , Y =  $\beta$ , 5, 6 ou 8 et Z = 11, 50 ou 100%. Par exemple, les nanoplastiques synthétisés à partir de 11% de styrène- $(^2\text{H})_8$  seront appelés NP- $(^2\text{H})_8$ -11%. Les nanoplastiques synthétisés à partir de styrène non enrichi, ayant donc des abondances naturelles en deutérium et en carbone  $^{13}\text{C}$  seront appelés NP<sub>Nat</sub>.

### III. 2. Nanoplastiques marqués au deutérium

#### III. 2. 1. NP- $(^2\text{H})_8$

Dans un premier temps, la méthode de polymérisation sans tensioactif présentée précédemment a été réalisée pour synthétiser des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du monomère styrène- $(^2\text{H})_8$ . Dans ce monomère, tous les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de deutérium. Des taux de 11%, 50% et 100% de monomère enrichi (quantité molaire du styrène enrichi par rapport au styrène total) ont été testés afin de couvrir une large gamme d'enrichissement.

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

---

Seule la synthèse réalisée à l'aide de 11% de styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub> et 89% de styrène non enrichi a permis une polymérisation significative. Les synthèses mettant en jeu 50% et 100% de styrène enrichi avec 8 deutériums ont obtenu des taux de conversion en polymère inférieurs à 5%. En ce qui concerne les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11%, on peut voir dans le Tableau 2.2 que le rendement en polymère, c'est-à-dire à la fois des nanoparticules et des agrégats ( $X_{\text{total}}$ ) est comparable à celui obtenu pour les nanoplastiques non marqués. Cependant, le taux d'agrégats ( $X_{\text{agrégats}}$ ) est, quant à lui, beaucoup plus élevé (23% au lieu de 9%), ce qui indique un rendement en nanoplastiques ( $X_{\text{particules}}$ ) plus faible par rapport à la même synthèse avec le monomère non enrichi (50% au lieu de 70%). Malgré les rendements relativement bas, les nanoplastiques obtenus sont sphériques, avec une morphologie de type « framboise », comme on peut le voir dans la Figure 2.7. En revanche, ils ont des diamètres plus faibles que les nanoplastiques non marqués, et une dispersité de taille plus grande. En ce qui concerne la stabilité des nanoplastiques, elle nous est indiquée par le potentiel zéta qui renseigne sur la charge de surface des particules : si la valeur absolue du potentiel zéta des particules est supérieure à 30 mV, alors la dispersion est considérée comme très stable.<sup>160</sup> Ici, les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11% ont un potentiel zéta de -48 mV, la dispersion est donc considérée comme très stable.

La technique d'émulsion sans tensioactif n'ayant pas permis de synthétiser des nanoplastiques avec plus de 11% de styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>, une émulsion avec tensioactif a également été réalisée pour déterminer si la synthèse de nanoplastiques contenant uniquement ce monomère marqué est réalisable. Pour cela, l'acide acrylique a été remplacé par un tensioactif non ionique (le Tergitol AP40, un nonylphénol avec 40 unités d'éthoxylate). Le choix a été fait d'utiliser un tensioactif non ionique afin de ne pas apporter de charges supplémentaires, et de rester sur des tailles de particules finales dans le même ordre de grandeur (100-300 nm) que celles obtenues juste en présence de comonomère hydrophile, l'utilisation d'un tensioactif classique de type dodécylsulfate de sodium (SDS) conduisant dans les mêmes conditions à des particules beaucoup plus petites. Dans les deux cas, en présence ou non de tensioactifs, les particules sont ainsi stabilisées par des oligomères hydrophiles (PAA ou Tergitol AP40). Les nanoplastiques synthétisés avec tensioactifs ont été appelés selon le même modèle de notation que les synthèses sans tensioactif, en ajoutant la mention **TA** faisant référence au tensioactif, c'est-à-dire **NP<sub>TA</sub>-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100%**.

En présence de Tergitol AP40, il a été possible de synthétiser des nanoplastiques à partir de styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub> seul avec à la fois un rendement en polymère et en nanoplastique très élevé : 97 et 91% respectivement (cf. Tableau 2.2). Comme attendu les nanoplastiques obtenus sont des sphères lisses (cf. Figure 2.7). On observe qu'également l'indice de polydispersité (PDI) est plus grand, ce qui indique une légère hétérogénéité de la taille des nanoplastiques, qui reste dans le même ordre de grandeur que les autres types de nanoplastiques (avec un diamètre moyen de 175 nm). D'après le potentiel zéta, les nanoplastiques sont malgré tout stables ( $\zeta < -30$  mV).

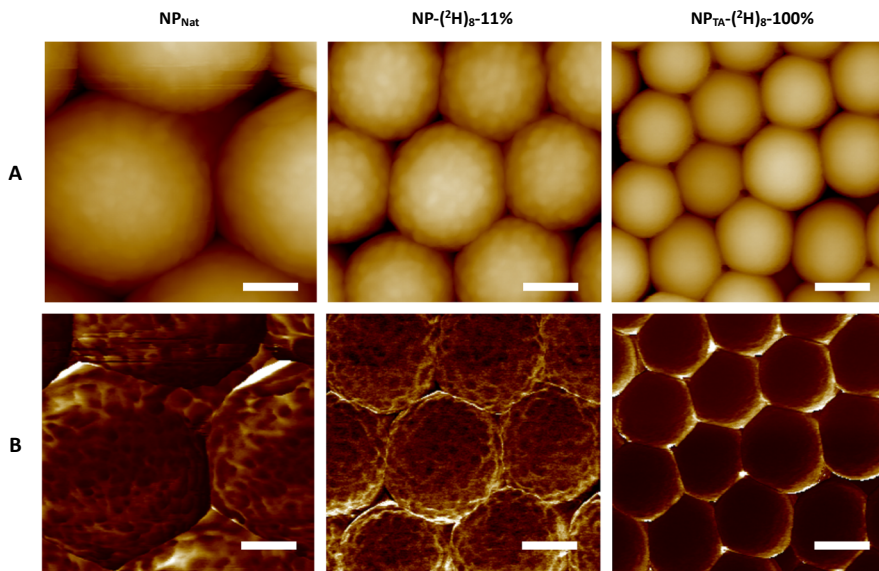
Bien qu'elle soit efficace pour polymériser le monomère deutéré styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>, cette technique de polymérisation présente de nombreux défauts. Les tensioactifs peuvent modifier leurs propriétés physico-chimiques ou encore leur toxicité. De plus, ces échantillons ne possèdent pas de groupements carboxyles en surface et la rugosité de surface associée. Ces caractéristiques ne les rendent pas idéaux pour être utilisés en tant que traceurs dans des études de transport, d'accumulation ou encore de toxicité. En revanche, leur fort taux d'enrichissement, leur taille contrôlée et leur forte stabilité en font de bons nanoplastiques modèles pour une utilisation en tant qu'étalons internes instrumentaux, pour la Py-GC/MS par exemple.

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotope

**Tableau 2.2:** Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques synthétisés à partir du styrène-( $^2\text{H}$ ) $_8$ .

Monomère	Emulsion sans tensioactif					Emulsion avec tensioactif
	Styrène	Styrène-( $^2\text{H}$ ) $_8$				Styrène-( $^2\text{H}$ ) $_8$
Nom	NP <sub>Nat</sub>	NP-( $^2\text{H}$ ) $_8$ -11%	NP-( $^2\text{H}$ ) $_8$ -50%	NP-( $^2\text{H}$ ) $_8$ -100% <sub>1</sub>	NP-( $^2\text{H}$ ) $_8$ -100% <sub>2</sub>	NP <sub>TA</sub> -( $^2\text{H}$ ) $_8$ -100%
$X_{\text{Se}}$	0%	11,1%	50,1%	100%	100%	100%
$X_{\text{AA}}$	18,2%	18,1%	18,0%	17,4%	17,4%	-
$w_{\text{TA}}$	-	-	-	-	-	6,0%
$X_{\text{APS}}$	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,4%	1,0%
$X_{\text{total}}^{\text{a}}$	79%	73%	3,5%	3,0%	4,4%	97%
$X_{\text{agrégats}}^{\text{a}}$	9%	23%	0,0%	0,0%	0,0%	5%
$X_{\text{particules}}$	70%	50%	3,5%	3,0%	4,4%	91%
$d$ (nm) <sup>b, d</sup>	312 ± 6	187 ± 6	-	-	-	175 ± 5
$\text{PDI}$ <sup>c, d</sup>	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,08	-	-	-	0,08 ± 0,06
$\zeta$ (mV) <sup>e</sup>	-39 ± 1	-48 ± 2	-	-	-	-53 ± 2

Avec  $X_{\text{Se}} = n_{\text{Se}}/(n_{\text{Se}}+n_{\text{S}})$ ,  $X_{\text{AA}} = n_{\text{AA}}/(n_{\text{AA}}+n_{\text{Se}}+n_{\text{S}})$ ,  $w_{\text{TA}} = m_{\text{TA}}/(m_{\text{AA}}+m_{\text{Se}}+m_{\text{S}})$ ,  $X_{\text{APS}} = n_{\text{APS}}/(n_{\text{APS}}+n_{\text{AA}}+n_{\text{Se}}+n_{\text{S}})$ ,  $X_{\text{total}}$  : la conversion totale en polymère,  $X_{\text{agrégats}}$  : la conversion en agrégats,  $X_{\text{particules}}$  : la conversion en particules non agrégées, <sup>a</sup> déterminé par gravimétrie, <sup>b</sup> diamètre Z-average, <sup>c</sup> Indice de Polydispersité, <sup>d</sup> obtenu par DLS avec un algorithme cumulatif, <sup>e</sup> Potentiel zéta



**Figure 2.7:** Images AFM des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-( $^2\text{H}$ ) $_8$ , en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm.

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

### III. 2. 2. NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>

Nous avons vu que la polymérisation sans tensioactif du monomère styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> ne conduit à des nanoplastiques avec de bons rendements qu'avec une teneur en monomère marqué de 11%. Afin d'obtenir des nanoplastiques sans tensioactif contenant plus d'unités monomères marqués au deutérium, un autre monomère a été testé : le styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>. Ce monomère a la particularité d'avoir 5 atomes de deutérium (soit 62,5% des hydrogènes totaux) situés uniquement sur le cycle aromatique, partie de la molécule qui n'est pas directement mise en jeu dans la réaction de polymérisation (cf. Figure 2.3.). De la même façon que pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>, trois taux d'enrichissement différents ont été testés : 11%, 50% et 100%.

Cette fois-ci, des rendements satisfaisants ont été obtenus dans toutes les conditions (cf. Tableau 2.3), avec des rendements en particules compris entre 67% et 72%, c'est-à-dire des rendements comparables à ceux obtenus sans l'enrichissement au deutérium. Les nanoplastiques obtenus sont sphériques (cf. Figure 2.8) et monodisperses (PDI inférieur à 0,1) mais en comparaison aux nanoplastiques non marqués, on observe une diminution de leur taille avec la proportion de styrène enrichi utilisé dans la synthèse. De plus, bien que les nanoplastiques aient une surface plus irrégulière que les particules lisses synthétisées avec tensioactif, la morphologie de type « framboise » (attendue en raison de la quantité d'acide acrylique utilisée) n'a pas été atteinte. Comme pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>, la mesure du potentiel zéta indique que les nanoplastiques stables ( $\zeta < -30$  mV), pour toutes les conditions.

**Tableau 2.3:** Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>.

Monomère	Styrène	Styrène-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub>		
	NP <sub>Nat</sub>	NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -11%	NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -50%	NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%
<b>X<sub>Se</sub></b>	0%	11,1%	50,1%	100,0%
<b>X<sub>AA</sub></b>	18,2%	18,0%	17,9%	18,2%
<b>X<sub>APS</sub></b>	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
<b>X<sub>total</sub><sup>a</sup></b>	79%	71%	76%	76%
<b>X<sub>agrégats</sub><sup>a</sup></b>	9%	4%	4%	5%
<b>X<sub>particules</sub></b>	70%	67%	72%	71%
<b>d (nm)<sup>b, d</sup></b>	312 ± 6 nm	180 ± 2 nm	145 ± 2 nm	129 ± 1 nm
<b>PDI<sup>c, d</sup></b>	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
<b>ζ (mV)<sup>e</sup></b>	-39 ± 1	-48 ± 2	-48 ± 1	-51 ± 2

Avec  $X_{Se} = n_{Se}/(n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{AA} = n_{AA}/(n_{AA}+n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{APS} = n_{APS}/(n_{APS}+n_{AA}+n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{total}$  : la conversion totale en polymère,  $X_{agrégats}$  : la conversion en agrégats,  $X_{particules}$  : la conversion en particules non agrégées, <sup>a</sup> déterminé par gravimétrie, <sup>b</sup> diamètre Z-average, <sup>c</sup> Indice de Polydispersité, <sup>d</sup> obtenu par DLS avec un algorithme cumulatif, <sup>e</sup> Potentiel zéta.

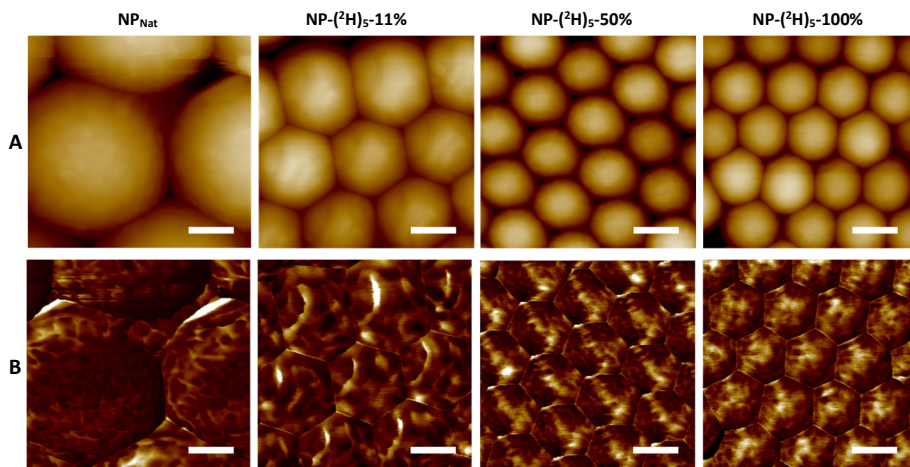


Figure 2.8: Images AFM des nanoplastiques marqués au deutérium à l'aide du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>, en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm.

### III. 3. Nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C

#### III. 3. 1. NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>

Des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C ont également été élaborés à partir de la méthode de polymérisation sans tensioactif tout d'abord à l'aide du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>, monomère enrichi avec un seul atome de carbone <sup>13</sup>C, positionné sur le carbone en position β de la double liaison, mise en jeu lors de la réaction de polymérisation (cf. Figure 2.3.). Comme cela a été fait avec les précédents monomères, plusieurs taux d'enrichissements ont été testés : 11%, 50% et 100% de monomère enrichi, le taux de 11% permettant d'obtenir des nanoplastiques avec une abondance deux fois plus grande que l'abondance naturelle en carbone <sup>13</sup>C.

Si des nanoplastiques ont été produits dans toutes les conditions, seules les synthèses réalisées avec 11% et 50% de styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub> ont des taux de conversion satisfaisants, avec des rendements en particules de 66% et 68%, respectivement (cf. Tableau 2.4). Pour la synthèse réalisée avec 100% de styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub> un rendement faible de 11,7% ( $X_{\text{particules}}$ ) a été obtenu. Comme pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>, plus la proportion de styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub> engagée dans la synthèse est grande, plus les nanoplastiques produits sont petits, particulièrement pour les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-100% qui ont un diamètre moyen de 67 nm (avec un PDI légèrement supérieur aux autres), contre 295 nm pour les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-11%. Les nanoplastiques sont tous sphériques mais on observe néanmoins des différences de morphologie de surface en fonction de la composition (cf. Figure 2.9). Ainsi, les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-11% ont la morphologie de type « framboise », les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-100% semblent également avoir une surface rugueuse, contrairement aux NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-50%, qui ont une surface lisse. Comme pour les nanoplastiques deutérés, la mesure du potentiel zéta nous indique que les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-11% et NP-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>-50% sont stables ( $\zeta < -30$  mV).

III. 3. 2. NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>

Afin d'atteindre un marquage en carbone <sup>13</sup>C plus fort, un autre monomère a été utilisé : le styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>. Contrairement au styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub>, ce monomère est composé de 6 atomes de carbone <sup>13</sup>C (soit 75% du carbone total), situés sur le cycle aromatique. Le site réactionnel de la polymérisation (la double liaison) n'est pas marqué. Pour ce monomère, seule la synthèse avec 100% de monomère marqué a été testée.

Un rendement satisfaisant de 71% ( $X_{particules}$ ) a été obtenu pour cette synthèse (cf. Tableau 2.4) qui a permis l'élaboration de nanoplastiques sphériques et monodisperses (PDI inférieur à 0,1), avec une surface rugueuse de type « framboise » (cf. Figure 2.9). Enfin, comme pour les autres nanoplastiques, le potentiel zéta est inférieur à -30 mV ce qui indique de la dispersion est stable.

Tableau 2.4: Conditions de polymérisation et caractérisations des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C à l'aide du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub> ou du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>.

Monomère	Styrène	Styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub>			Styrène-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub>
Nom	NP <sub>Nat</sub>	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -11%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -50%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -100%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%
$X_{Se}$	0%	11,2%	50,1%	100,0%	100,0%
$X_{AA}$	18,2%	18,1%	18,0%	18,6%	18,0%
$X_{APS}$	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
$X_{total}^a$	79%	75%	75%	13,5%	71%
$X_{agrégats}^a$	9%	9%	7%	1,8%	5%
$X_{particules}$	70%	66%	68%	11,7%	66%
$d$ (nm) <sup>b, d</sup>	312 ± 6 nm	295 ± 2	185 ± 2	67 ± 2	214 ± 2
PDI <sup>c, d</sup>	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,02 ± 0,02
$\zeta$ (mV) <sup>e</sup>	-39 ± 1	-51 ± 1	-56 ± 2	-	-43 ± 3

Avec  $X_{Se} = n_{Se}/(n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{AA} = n_{AA}/(n_{AA} + n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{APS} = n_{APS}/(n_{APS}+n_{AA} + n_{Se}+n_S)$ ,  $X_{total}$  : la conversion en polymère,  $X_{agrégats}$  : la conversion en agrégats,  $X_{particules}$  : la conversion en particules non agrégées, <sup>a</sup> déterminé par gravimétrie, <sup>b</sup> diamètre Z-average, <sup>c</sup> Indice de Polydispersité, <sup>d</sup> obtenu par DLS avec un algorithme cumulatif, <sup>e</sup> Potentiel zéta.

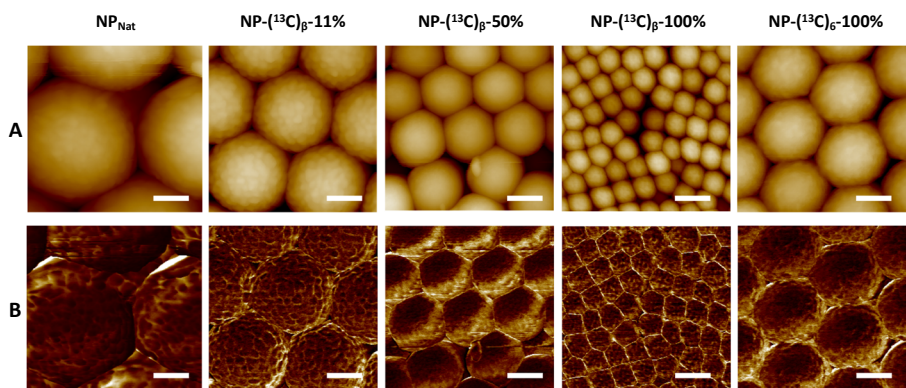


Figure 2.9: Images AFM des nanoplastiques marqués carbone <sup>13</sup>C à l'aide du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>β</sub> ou du styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>, en hauteur (A) et en adhésion (B). Barre d'échelle à 100 nm.

### III. 4. Effets isotopiques

#### III. 4. 1. Les effets isotopiques dans nos résultats de synthèse

Les caractérisations de nos produits de synthèse donnent des résultats (rendements, tailles des nanoplastiques, etc) divers en fonction des monomères utilisés et de la proportion de styrène enrichi par rapport au styrène non enrichi. Théoriquement, ce phénomène pourrait être expliqué par différents paramètres tels que la nature et la quantité d'inhibiteur présent dans les monomères, ou bien par les propriétés des monomères, modifiées par la présence des isotopes, qui pourraient influencer la stabilité des émulsions ou leur réactivité lors des étapes de la polymérisation : réactions d'amorçage, de propagation ou de terminaison. L'action des inhibiteurs peut déjà être écartée puisque, dans le cas du styrène- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ , qui contient moins d'inhibiteur que le styrène non enrichi, les rendements ont été tout de même diminués (cf. Tableau 2.1). Il est probable que les différences entre les synthèses avec et sans monomère marqué soient dues à des effets isotopiques.

Pour rappel, les rendements les plus bas, voire proches de zéro, ont été observés pour 50% et 100% de styrène- $(^2\text{H})_8$ . Ce monomère a la particularité d'avoir tous les atomes d'hydrogène remplacés par des atomes de deutérium y compris au niveau de la double liaison qui est mise en jeu de façon directe lors du mécanisme réactionnel (cf. Figure 2.3.). Un rendement très bas a également été observé lors de la synthèse avec 100% de styrène- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ , monomère enrichi avec un seul atome de carbone  $^{13}\text{C}$ , également positionné sur la double liaison, au niveau du carbone  $\beta$ .

Au-delà des effets sur les rendements, une diminution de la taille des nanoplastiques et une modification de leur morphologie de surface a été observée sur les nanoplastiques issus du monomère styrène- $(^2\text{H})_5$ . Ce monomère comporte 5 atomes de deutérium situés uniquement sur le cycle aromatique, partie de la molécule qui n'est pas directement mise en jeu dans la réaction de polymérisation. Enfin, le dernier monomère styrène- $(^{13}\text{C})_6$ , qui porte 6 atomes de carbone  $^{13}\text{C}$  au niveau du cycle aromatique a permis l'obtention de nanoplastiques assez proches de ceux sans marquage, avec de bons rendements, une morphologie de type framboise comme attendue, mais des tailles plus faibles que celles des nanoplastiques non marqués.

Pour conclure sur nos résultats, la substitution du styrène non marqué par un styrène marqué a affecté le mécanisme de polymérisation avec pour conséquences, des impacts sur le rendement, et/ou sur les propriétés des particules obtenues (taille, dispersité, morphologie de surface, stabilité). Nos travaux nous permettent de comparer les effets des différents styrènes marqués au deutérium : styrène- $(^2\text{H})_8$ , styrène- $(^2\text{H})_5$  et au carbone  $^{13}\text{C}$  : Styrène- $(^{13}\text{C})_{\beta}$  et Styrène- $(^{13}\text{C})_6$ . Les différences observées entre les synthèses semblent être dues à des effets isotopiques liés, non pas au nombre d'isotopes présents dans le monomère, mais surtout à leur position dans la molécule et à leur nature, ici deutérium ou carbone  $^{13}\text{C}$ . Ainsi, les effets sont bien plus forts lorsque les isotopes sont placés au niveau de la double liaison mise en jeu directement pendant la réaction radicalaire (cf. Figure 2.3.). Et entre les deux isotopes, l'échange par un deutérium a plus d'effet que l'échange d'un carbone  $^{13}\text{C}$ , ce qui est cohérent avec les effets isotopiques qui sont généralement relatifs à la variation de masse entre les deux isotopes échangés.<sup>161</sup> En effet, remplacer un hydrogène par un deutérium augmente la masse de 100%, alors qu'elle n'est augmentée que 8,3% lors de l'échange du carbone  $^{12}\text{C}$  à un carbone  $^{13}\text{C}$ .



III. 4. 2. Etude de l'incorporation des monomères au Py-GC/MS

Afin de mieux comprendre les variations observées sur les différentes synthèses, certains nanoplastiques marqués au deutérium ont été analysés en Py-GC/MS. Lorsque le polystyrène est pyrolysé, il est fractionné en différents fragments, le monomère étant le fragment majoritaire. Les proportions du fragment marqué par rapport au non marqué, des différents nanoplastiques deutérés ont été calculés à partir des aires des fragments marqués ( $m/z=112$  pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub> et  $m/z=109$  pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>) et du fragment non marqué de masse  $m/z=104$ , et sont reportés en pourcentage dans le Tableau 2.5.

**Tableau 2.5:** Analyse par Py-GC/MS des nanoplastiques deutérés : proportion de l'aire du fragment marqué, (styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub> de masse  $m/z=112$  pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>, et styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub> de masse  $m/z=109$  pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>), et le fragment non marqué de masse  $m/z=104$ , en pourcentage.

X <sub>Se</sub>	NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>8</sub>		NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>5</sub>
	Emulsion sans tensioactif	Emulsion avec tensioactif	Emulsion sans tensioactif
11,1%	7,9%	-	9,4%
100%	94,3% (NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>8</sub> -100% <sub>1</sub> ) 85,9% (NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>8</sub> -100% <sub>2</sub> ) 64,1% (NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>8</sub> -100% <sub>3</sub> )	99,9%	99,5%

Les analyses par Py-GC/MS nous montrent que les synthèses engagées avec 11,1% de monomère marqué conduisent à des polymères dans lesquels seulement 9,4% d'unités marquées sont détectées pour NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-11% et 7,9% pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11%. Notons que ces deux synthèses sont obtenues avec des rendements ( $X_{\text{total}}$ ) similaires 71% et 73% pour les synthèses de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-11% et NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11% respectivement. Pour les synthèses contenant uniquement du styrène marqué, des pourcentages de styrène marqué proches de 100% ont été obtenus pour les NP-TA-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100%, synthétisés avec tensioactifs, et les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%. Pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100% en revanche, cette fraction est différente de 100%, indiquant une fraction non négligeable de polymère non enrichi par rapport au polymère enrichi. Or, ces synthèses ont été réalisées avec uniquement du monomère enrichi, on ne devrait pas donc pas retrouver de fragment de masse  $m/z=104$ , ou alors dans des quantités très faibles, car le styrène non enrichi peut être présent en tant qu'impureté dans les monomères enrichis. Les rendements de synthèse des NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100% étant inférieurs à 5% (Tableau 2.2) et les résultats de leur analyse par Py-GC/MS présentant une grande disparité entre les échantillons, il n'est pas possible de tirer de conclusions précises. Cependant, ces résultats questionnent sur l'éventualité d'une polymérisation préférentielle du styrène non enrichi par rapport au monomère enrichi, en particulier pour le monomère styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>, mais potentiellement aussi pour le styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>, à plus faible mesure. Cette hypothèse pourrait également expliquer les fractions calculées pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-11% et pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11%, inférieures à celles que l'on devrait retrouver théoriquement.

### III. 4. 3. Les effets isotopiques sur la polymérisation du styrène dans la littérature

Les polymères marqués à l'isotopie sont des matériaux de choix dans l'étude des structures et nanostructurations par diffusion de neutrons depuis des décennies. Cependant, la substitution d'un atome léger par un homologue plus lourd n'est pas anodine puisqu'elle peut modifier de manière significative la réactivité des molécules marquées.<sup>162,163</sup>

Les effets isotopiques découverts en même temps que les isotopes dans les années 30,<sup>162</sup> peuvent jouer sur la réactivité d'une réaction au travers de différents aspects tels que la constante d'équilibre, on parle alors d'effet isotopique thermodynamique, ou la vitesse de réaction, on parle alors d'effet isotopique cinétique (*kinetic isotope effect*, KIE, en anglais).<sup>164</sup> Les effets isotopiques cinétiques sont définis par le ratio des constantes de vitesse (celle de l'isotope le plus lourd au dénominateur),  $k_H/k_D$  dans le cas du deutérium. Lorsque le ratio est supérieur à 1, la vitesse est plus rapide pour l'isotope le plus léger, l'effet isotopique est alors appelé effet normal, alors qu'on parle d'effet inverse quand le ratio est inférieur à 1 et que l'isotope le plus lourd est favorisé.<sup>164</sup> On distingue également les effets isotopiques cinétiques primaires, se produisant lors de la formation ou rupture d'une des liaisons rattachées à l'isotope, des effets isotopiques cinétiques secondaires, observés lorsqu'aucune des liaisons rattachées à l'isotope n'est rompue ou formée. Dans le cas du deutérium, les effets isotopiques primaires sont généralement normaux ( $k_H/k_D > 1$ ) puisqu'en raison de sa masse plus élevée, la dissociation d'une liaison C-D requiert plus d'énergie que la liaison C-H.<sup>162</sup>

Bien qu'à notre connaissance, aucune publication n'ait décrit les effets isotopiques dans le cas précis d'une polymérisation en émulsion sans tensioactif du styrène marqué à l'isotopie et de l'acide acrylique, plusieurs publications ont reporté des effets isotopiques lors de polymérisation du styrène.

Ainsi, Pryor et al. ont étudié la polymérisation radicalaire en masse de différents styrènes deutérés, avec un amorçage par l'AIBN. Ils ont observé un effet isotopique inverse pour l'étape de propagation avec une polymérisation du styrène sur lui-même favorisée quand celui-ci est deutéré ( $k_H/k_D < 1$ ).<sup>165</sup> De manière similaire, Clouet et Chaffanjon ont étudié la polymérisation radicalaire en masse du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>, en présence d'AIBN ou de BPO comme amorceurs, et ont également observé un effet isotopique inverse pour l'étape de propagation, avec une énergie d'activation plus faible pour le styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> que pour le styrène non marqué. Cependant, concernant l'étape de terminaison, l'énergie d'activation de la réaction de terminaison a été calculée comme 1,5 fois plus élevée pour le styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> que le styrène non marqué, résultant à une augmentation de la proportion de réactions de combinaison au regard des réactions de terminaison par combinaison (pas de création de liaison) comparées à la dismutation (création de liaison).<sup>166</sup>

Wright et al. ont quant à eux étudié la polymérisation du styrène en milieu organique (toluène) amorcé par l'AIBN selon une méthode radicalaire contrôlée (par réaction de transfert d'atome). A nouveau, des différences sont observées entre les réactivités des monomères marqués et non marqués. Les polymérisations du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> ont des rendements plus faibles que celles du styrène non marqué et les polymères deutérés ont des dispersités de masse molaire plus élevées.<sup>167</sup>

De Bruyn et al. ont synthétisé par polymérisation en émulsion, en présence de tensioactif anionique (AMA-80 : dihexyl sulfosuccinate de sodium), des nanoparticules de polystyrène, fonctionnalisées en

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

---

surface par de l'acide acrylique.<sup>168</sup> Lorsque le styrène est remplacé par du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> commercial, ils ont obtenu des nanoparticules avec une « coquille » en poly(acide acrylique) plus fine que les mêmes nanoparticules synthétisées dans les mêmes conditions avec du styrène non marqué et de l'acide acrylique marqué, montrant une polymérisation privilégiée du styrène avec lui-même.<sup>168</sup>

La polymérisation du styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> en milieu dispersé sans tensioactif a été abordé par Lahmar et al.<sup>169</sup> Leur système est différent de notre protocole puisque le comonomère stabilisant n'est pas un acide acrylique mais un monomère porteur d'un groupement hydrophile non ionique, l'éthylène glycol. Les propriétés chélatantes des particules obtenues étant recherchées, ce comonomère porte aussi une fonction hétérocyclique à base de triazole. Comme les travaux menés en procédé homogène (Wright en al. <sup>167</sup>), le marquage du monomère à l'isotopie abaisse les rendements de polymérisation, et change les propriétés des particules obtenues, avec l'obtention de particules plus grandes et plus polydisperses après polymérisation de styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>, comparé au styrène non marqué. L'analyse de la composition des particules a montré que les particules marquées ont une plus forte teneur en unités monomère hydrophile, en d'autres termes, le styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> participe moins à la polymérisation que le styrène non marqué.

Ces différents travaux reportés à titre d'exemples, montrent que les effets isotopiques sont complexes. Néanmoins, toutes ces études s'accordent sur le fait que le remplacement d'un atome par un isotope plus lourd a des conséquences sur la réactivité de la molécule. Lorsqu'il s'agit de monomères, cet effet est amplifié quand la substitution concerne un des atomes de la double liaison mis en jeu dans la réaction de polymérisation. Les effets ont été reportés sur toutes les étapes de la polymérisation radicalaire : amorçage, propagation et terminaison.<sup>170</sup> Les rendements de polymérisation sont affectés ainsi que les propriétés des polymères (masses molaires, dispersité). Des effets ont aussi été observés dans le cas de copolymérisation en émulsion, y compris en absence de tensioactif, avec un impact sur les propriétés des particules obtenues (taille, dispersité, composition, etc.), ce qui est en adéquation avec nos propres observations.

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études reportant des effets isotopiques dans le cas précis d'une polymérisation en émulsion sans tensioactif avec de l'acide acrylique. Il est donc difficile d'expliquer précisément les effets observés sur nos synthèses, d'autant plus parce que la polymérisation en émulsion sans tensioactif est un cas particulier d'émulsion qui repose sur de nombreux paramètres. En effet, la réaction dépend tout d'abord de la polymérisation des monomères présents en phase aqueuse (AA et la fraction du styrène soluble en phase aqueuse) formant des oligomères, puis de leur précipitation lorsqu'ils atteignent une taille critique (étape de nucléation) pour former les sites de polymérisation des futures particules, et enfin, la stabilité de ces sites et des particules finales repose sur fraction de copolymère hydrophile.<sup>158</sup> Ainsi, tout changement au niveau de la réactivité des comonomères, seuls ou l'un vis-à-vis de l'autre, ou leurs propriétés, telle que leur polarité, pourraient exercer une influence sur la synthèse. Les effets isotopiques observés dans nos travaux pourraient donc être expliqués par une modification d'un ou plusieurs de ces paramètres. Parmi ces paramètres, il est possible que la polarité du styrène ait joué un rôle, puisque plusieurs articles mentionnent que le styrène et le polystyrène deutéré sont plus polaires, car plus électrodonneurs, que leurs homologues non marqués.<sup>167,171</sup> Ces premières hypothèses nécessiteraient d'être confirmées par une étude à part entière qui n'était pas l'objet de cette thèse.

## IV. Caractérisation des nanoplastiques marqués

### IV. 1. Détermination de la fraction de polyacrylique par RMN.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$ , réalisé pour les nanoplastiques non marqués, est présenté dans la Figure 2.10 :

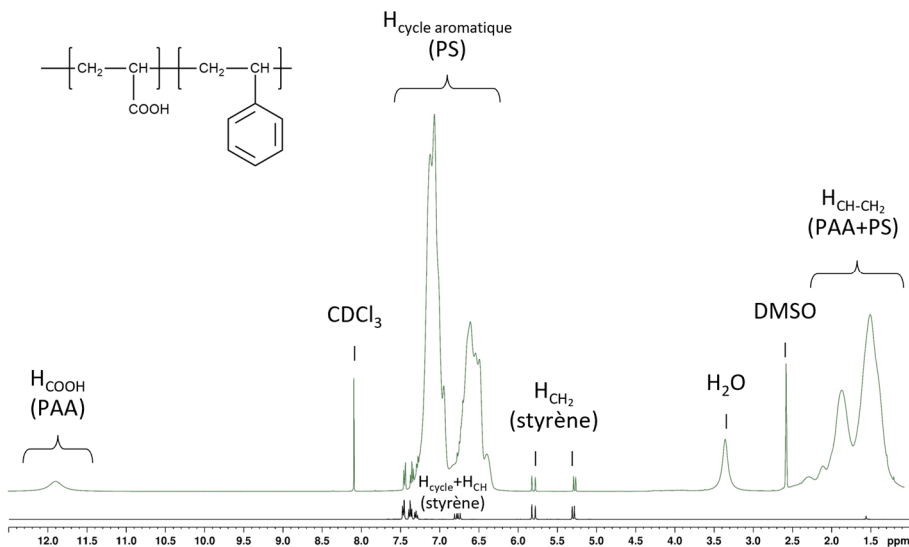


Figure 2.10: Spectre RMN  $^1\text{H}$  des nanoplastiques non marqués (vert) et du styrène non marqué (noir).

La proportion de poly(acide acrylique) (PAA) présent dans les nanoplastiques peut être déterminée par deux méthodes différentes, soit à l'aide des protons de la liaison  $\text{CH}-\text{CH}_2$  (cf. équation 2.6), soit à l'aide des protons des groupements carboxyles (cf. équation 2.7).

$$x_{Ac} = \frac{A(H_{\text{CH}-\text{CH}_2}) - 3 * A(H_{\text{cycle}})}{3} \quad 2.6$$

Avec :

- $x_{Ac}$  : Fraction molaire du polyacrylique.
- $A(H_{\text{CH}-\text{CH}_2})$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  de la liaison  $\text{CH}-\text{CH}_2$  du PS et du PAA.
- $A(H_{\text{cycle}})$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  du cycle aromatique du PS, fixé à 5.

$$x_{Ac} = A(H_{\text{COOH}}) \quad 2.7$$

Avec :

- $x_{Ac}$  : Fraction molaire du polyacrylique.
- $A(H_{\text{COOH}})$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  du groupement carboxyle du PAA, avec  $A(H_{\text{cycle}})$  fixé à 5.

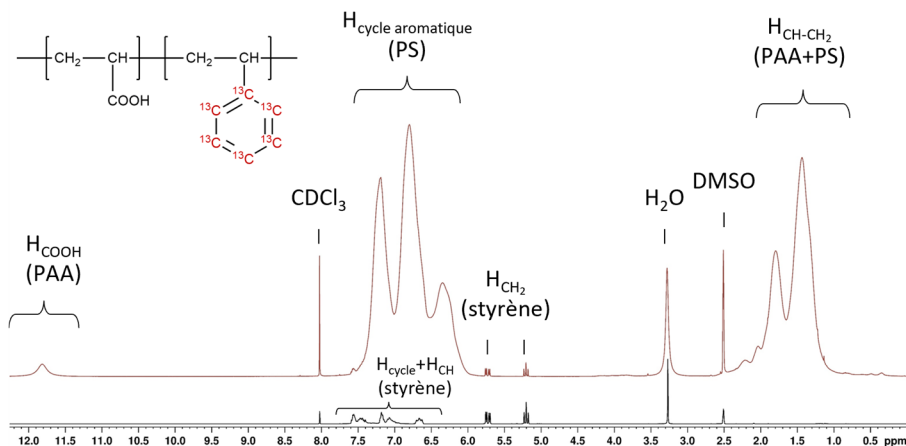
D'après le spectre du styrène non marqué (en noir dans la Figure 2.10), il reste toujours des résidus de monomère dans les nanoplastiques, résidus qui apportent une contribution dans le pic des  $^1\text{H}$  du cycle aromatique du PS, situé entre 6,2 et 7,1 ppm. L'aire de ce pic peut être corrigée pour prendre en compte ces résidus de synthèse grâce à l'équation 2.8.

$$A(H_{\text{cycle}})_{\text{corr}} = A(H_{\text{cycle}}) - (A(H_{\text{CH}_2})_{\text{NP}}^{\text{styrène}} * A(H_{\text{cycle}} + H_{\text{CH}})_{\text{monomère}}^{\text{styrène}}) \quad 2.8$$

## CHAPITRE 2. Synthèse et caractérisation de nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie

Avec :

- $A(H_{\text{cycle}})_{\text{corr}}$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  du cycle aromatique du PS corrigée *i.e.* sans la contribution des résidus de monomère.
- $A(H_{\text{cycle}})$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  du cycle aromatique du PS, non corrigée *i.e.* avec la contribution des résidus de monomère.
- $A(H_{\text{CH}_2})_{\text{NP}}^{\text{styrène}}$  : Aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  d'un  $\text{CH}_2$  (à 5,3 ppm par exemple) du styrène présent en tant que résidus dans les NP.
- $A(H_{\text{cycle}} + H_{\text{CH}})_{\text{monomère}}^{\text{styrène}}$  : Aire totale des pics correspondant aux  $^1\text{H}$  du cycle et du CH du styrène lors de l'analyse du monomère seul, avec l'aire du pic correspondant aux  $^1\text{H}$  d'un  $\text{CH}_2$  (à 5,3 ppm par exemple) du styrène  $A(H_{\text{CH}_2})_{\text{monomère}}^{\text{styrène}}$  fixé à 1.



**Figure 2.11:** Spectre RMN des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ , NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% (rouge) et du styrène non marqué (noir).

L'analyse en RMN  $^1\text{H}$  a également été réalisée pour les NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, dont le spectre est présenté en Figure 2.11. La proportion de PAA a pu être calculée de la même façon que les nanoplastiques non marqués, puisque le marquage au carbone  $^{13}\text{C}$  modifie l'allure des pics (dû au couplage  $\text{J}^{1\text{H}}\text{-}^{13}\text{C}$ ), mais n'influe pas sur l'aire globale des pics. Les résultats pour les deux nanoplastiques sont présentés dans le Tableau 2.6.

**Tableau 2.6:** Proportion de polyacrylique calculée par RMN pour les NP<sub>Nat</sub> et les NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%

	NP <sub>Nat</sub>	NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%
$x_{\text{ac}}$ avec $A(\text{CH}-\text{CH}_2)$	13,9 %	9,5 %
$x_{\text{ac}}$ avec $A(\text{H}_{\text{COOH}})$	12,9 %	9,7 %
$x_{\text{ac}}$	$13,4 \pm 0,7$ %	$9,6 \pm 0,1$ %

On remarque globalement que la proportion de PAA présente dans les nanoplastiques est plus faible que la fraction mise en jeu dans la réaction (18%), ce qui indique que tout l'acide acrylique n'a pas été polymérisé dans les nanoplastiques.

#### IV. 2. Titration des groupements carboxyles à la surface des nanoplastiques

Il existe plusieurs méthodes pour quantifier les groupements carboxyles à la surface d'une particule.<sup>119</sup> Dans la méthode développée par Pessoni *et al.*, les groupements carboxyles étaient quantifiés par titration potentiométrique.<sup>107</sup> Cependant, cette méthode présente des inconvénients. Tout d'abord, la dissolution du CO<sub>2</sub> de l'air produit du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup> qui peuvent faire varier les résultats des titrations potentiométriques ou conductimétriques.<sup>119</sup> De plus, cette méthode de titration demande une quantité importante d'échantillon de NP, ce qui est un frein dans le cas des nanoplastiques marqués à l'isotope, synthétisés en faible quantité à partir de monomères coûteux.

Il est également possible de quantifier des groupements fonctionnels en les liant, de manière covalente ou par des interactions électrostatiques, à des composés quantifiables, tels que des colorants, des groupements fluorescents, etc.<sup>119</sup> Sur ce principe, Henning *et al.* ont proposé, pour la titration des groupements carboxyles une méthode de titration colorimétrique, schématisée dans la Figure 2.12, qui repose sur les propriétés des ions divalents métalliques à, tout d'abord, s'adsorber, de manière rapide, sur les groupements carboxyles, mais aussi, à se complexer avec le pyrocatechol violet (PV).<sup>159</sup> En effet, ce colorant est vert lorsqu'il est libre en solution et il devient bleu quand il forme un complexe avec des ions divalents métalliques tels que les ions Ni<sup>2+</sup>. Ce changement est visible sur le spectre d'absorption UV-visible, présenté dans la Figure 2.13 qui montre la variation (linéaire) du signal d'absorbance du PV vers 400 nm (diminution du pic en présence de Ni<sup>2+</sup>) et 600 nm (augmentation du pic en présence de Ni<sup>2+</sup>), en fonction de la quantité de Ni<sup>2+</sup> présent en solution.

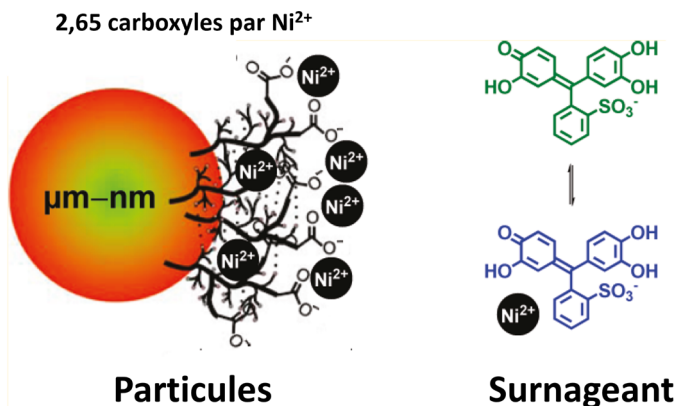


Figure 2.12: Principe général de la méthode de titration colorimétrique de groupements carboxyles situées à la surface de nanoplastiques proposée par Henning *et al.* Adapté de Henning *et al.* <sup>159</sup>

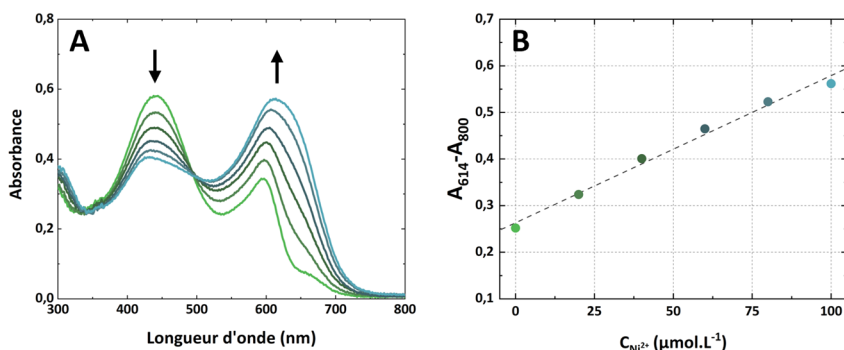


Figure 2.13: Analyse en spectroscopie UV-visible du complexe pyrocatechol violet- $\text{Ni}^{2+}$  en fonction de la concentration de  $\text{Ni}^{2+}$  (entre 0, en vert, et  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , en bleu) pour  $C_{pv} = 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , avec en A, les spectres d'absorption et en B, la variation de l'absorbance à 614 nm corrigée ( $A_{614} - A_{800}$ ) en fonction de la concentration de  $\text{Ni}^{2+}$ . (---) régression linéaire avec  $R^2 = 0,989$ .

Cette méthode pouvant être réalisée avec environ 10 fois moins de nanoplastiques que pour la titration potentiométrique, elle a été testée pour quantifier les groupements carboxyles des nanoplastiques marqués. Pour cela, différentes quantités de nanoplastiques ont été mises en contact avec une quantité constante d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ , pour un volume total constant. Après centrifugation, le surnageant contenant les ions  $\text{Ni}^{2+}$  en excès a été analysé par spectroscopie UV-visible en présence de pyrocatechol violet (PV). La représentation de l'absorbance à 614 nm corrigée par celle à 800 nm ( $A_{614 \text{ corr}} = A_{614} - A_{800}$ ) en fonction du volume de dispersion de nanoplastiques présentée, à titre d'exemple pour les  $\text{NP}_{\text{Nat}}$ , dans la Figure 2.14, montre la variation du signal d'absorbance du PV en fonction de la quantité de  $\text{Ni}^{2+}$  présent en solution.

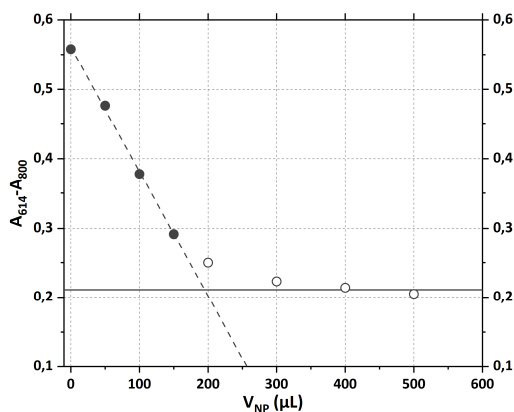


Figure 2.14: Absorbance du pyrocatechol violet corrigée ( $A_{614} - A_{800}$ ) en fonction du volume de dispersion de nanoplastiques, pour une quantité constante d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  ( $C_{\text{Ni}^{2+}} = 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Régression linéaire pour  $V_{NP} < V_{eq}$  (---) de la forme  $A_{614 \text{ corr}} = a \cdot V_{NP} + b$ ,  $A_{PV}$  (—).

La Figure 2.14 montre que plus la quantité de nanoplastiques initialement mis en contact avec le nickel est grande, moins il reste des ions  $\text{Ni}^{2+}$  libres dans le surnageant. On observe donc une diminution linéaire de l'absorbance  $A_{614 \text{ corr}}$  jusqu'à un certain point. Lorsque la quantité de NP, et donc de groupements COOH pouvant adsorber le nickel, est supérieure à la quantité de nickel disponible (pour  $V_{NP} > V_{eq}$ ), tout le nickel est adsorbé sur les NP, il ne reste donc plus d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  dans

le surnageant. Par conséquent la solution analysée en spectroscopie UV-visible va absorber de la même manière qu'une solution simple de PV (pour  $A_{614 \text{ corr}}$  noté  $A_{PV}$ ). La régression linéaire obtenue pour  $V_{NP} < V_{eq}$ , de la forme  $A_{614 \text{ corr}} = a \cdot V_{NP} + b$ , ainsi que l'absorption du PV en absence de nickel  $A_{PV}$  permettent de remonter à la quantité de groupements carboxyles en  $\mu\text{mol/g}$ , grâce à l'équation 2.4 et en  $\#/\text{nm}^2$  grâce à l'équation 2.5 :

$$C_{COOH} (\mu\text{mol/g}) = \frac{n * C_{Ni} * V_{tot} * a}{C_{NP} * (A_{PV} - b)} \quad 2.4$$

Avec :

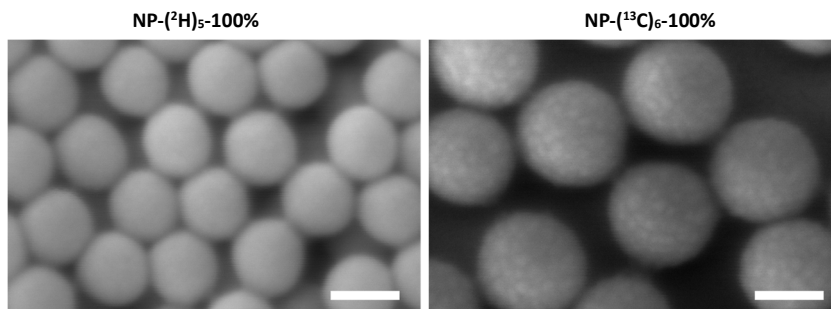
- $C_{COOH}$  : concentration des COOH en  $\mu\text{mol/g}$
- $n$  : facteur stœchiométrique indiquant le nombre de COOH liés par atomes de cations déterminé comme étant égal à  $2,65 \pm 0,12$ .<sup>159</sup>
- $C_{Ni}$  :  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$
- $V_{tot}$  :  $600 \mu\text{L}$
- $a$  : pente de la régression linéaire
- $C_{NP}$  :  $2 \text{ g.L}^{-1}$
- $A_{PV}$  : absorbance du PV en absence de  $\text{Ni}^{2+}$
- $b$  : ordonnée à l'origine de la régression linéaire

Cette méthode a été appliquée sur les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, ainsi que sur les NP<sub>Nat</sub>, pour lesquelles la méthode potentiométrique a également été réalisée. Dans le cas des NP<sub>Nat</sub>, des résultats cohérents ont été obtenus avec les deux méthodes.

**Tableau 2.7:** Concentrations des groupements carboxyles des NP<sub>Nat</sub>, NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, en  $\mu\text{mol/g}$  et nombre de groupement par  $\text{nm}^2$ .

Nom des NP	NP <sub>Nat</sub>		NP-( $^2\text{H}$ ) <sub>5</sub> -100%	NP-( $^{13}\text{C}$ ) <sub>6</sub> -100%
	Potentiométrique	Colorimétrique	Colorimétrique	Colorimétrique
<b><math>C_{COOH}</math> (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</b>	257,7	$224 \pm 2$	$640 \pm 4$	$590 \pm 20$
<b><math>C_{COOH}</math> (<math>\#/\text{nm}^2</math>)</b>	8,9	$7,8 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$	$13,4 \pm 0,5$

En ce qui concerne les résultats des NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, on retrouve une densité de COOH en surface des particules plus forte pour les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ . Ces résultats sont cohérents avec la morphologie de surface des deux nanoplastiques, visible en imagerie AFM (cf. Figure 2.8 et Figure 2.9) et en imagerie MEB (cf. Figure 2.15) : une surface très rugueuse, de type « framboise » pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, et une morphologie moins rugueuse pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%, puisque cette morphologie de surface est due à la présence des groupements carboxyles à la surface des particules.



**Figure 2.15:** Image MEB des NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%. Barre d'échelle à 100 nm.



### IV. 3. Stabilité

Dans la partie III. 2. et la partie III. 3. nous avons vu que les mesures du potentiel zéta des nanoplastiques était, en valeur absolue, supérieures à 30 mV, ce qui indique que les dispersions sont stables dans le temps et que les nanoplastiques ont un comportement colloïdal et ne devrait pas subir d'agrégation.

Cependant, la présence, en quantité significative, d'ions ou autres interférents, peut éventuellement déstabiliser la dispersion. En vue de leur utilisation en tant que traceurs dans deux études écotoxicologiques présentées dans le Chapitre 4, la stabilité des NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et des NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% a été examinée plus particulièrement dans les milieux d'intérêt : une eau douce de référence (norme ISO 634), utilisée pour la culture des *Daphnia magna*, pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et de l'eau de mer, prélevée dans la mer Méditerranée dans les conditions décrites dans le CHAPITRE 4. II. 1. , pour les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%. Dans les deux cas, la taille et la dispersité des nanoplastiques ont été suivies par DLS pendant 7 jours, à une concentration supérieure à la concentration maximale étudiée pendant l'étude (50 ppm) et les mesures n'ont pas montré d'agrégation pendant cette durée (cf. Chapitre 4 partie III. 1. pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%, et partie IV. 1. NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%).

## Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de synthétiser sans tensioactif, ni additif, des nanoplastiques modèles marqués au deutérium ou au carbone  $^{13}\text{C}$ , chargés négativement par des groupements carboxyles de surface, imitant l'oxydation de surface des plastiques vieillissants dans la nature. Les différents monomères et taux d'enrichissement utilisés ont révélé des effets isotopiques ayant un impact sur le rendement et les propriétés finales des nanoplastiques modèles. Ces effets isotopiques semblent être dépendants, non pas du nombre d'isotopes présents dans le monomère, mais surtout de leur position dans la molécule et de leur nature ( $^2\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ ). L'impact le plus important a été observé lorsque des isotopes sont présents sur le groupement mis en jeu lors de la polymérisation des monomères (double liaison) et d'autant plus fort pour les deutériums que pour les carbones  $^{13}\text{C}$ .

Malgré ces effets isotopiques, des nanoplastiques marqués avec de forts taux d'enrichissement en deutérium ou en carbone  $^{13}\text{C}$  ont pu être synthétisés par polymérisation du styrène- $(^2\text{H})_5$  et du styrène- $(^{13}\text{C})_6$ , avec des rendements en polymère supérieurs à 70% et dans les deux cas, l'obtention de nanoplastiques sphériques et monodisperses. Grâce à un effet isotopique moins fort, les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%) ont des propriétés proches des nanoplastiques non marqués, avec un diamètre de 214 nm et une surface rugueuse de type « framboise ». Les nanoplastiques marqués au deutérium (NP- $(^2\text{H})_5$ -100%) ont quant à eux des diamètres plus petits de 129 nm et une surface plus lisse. Cependant, les deux nanoplastiques ont des potentiels zéta  $< -30$  mV ce qui confirme leur charge de surface négative et la stabilité de la dispersion, et ont des tailles homogènes pour l'ensemble des échantillons.

Des caractérisations complémentaires ont également été réalisées, tout d'abord par RMN pour déterminer la proportion de poly(acide acrylique) des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, donnée qui sera utile, dans le Chapitre 3, pour déterminer la signature isotopique de ces nanoplastiques. Les groupements carboxyles des NP- $(^2\text{H})_5$ -100% et NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% ont ensuite été titrés à l'aide d'une méthode de titration par suivi d'un complexe en spectrométrie UV-visible, qui a permis de confirmer la présence d'un plus grand nombre de COOH sur les NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, à la surface rugueuse, comparés aux NP- $(^2\text{H})_5$ -100% ayant une surface plus lisse. Enfin, la stabilité de ces deux nanoplastiques a été confirmée par DLS, dans les milieux d'intérêt (eau douce de référence et eau de mer, respectivement), en prévision de leur utilisation en tant que traceurs dans deux études écotoxicologiques présentées dans le Chapitre 4.



---

## CHAPITRE 3. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES NANOPLASTIQUES MARQUES A L'ISOTOPIE

---

## **CHAPITRE 3. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES NANOPLASTIQUES**

### **MARQUES A L'ISOTOPIE 85**

---

<b>Introduction</b> .....	<b>87</b>
<b>I. Bibliographie</b> .....	<b>88</b>
I. 1. Py-GC/MS.....	88
I. 2. EA-IRMS .....	93
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	<b>97</b>
II. 1. Matériels .....	97
II. 2. Méthodes.....	98
<b>III. Quantification des nanoplastiques par Py-GC/MS</b> .....	<b>99</b>
III. 1. Objectif .....	99
III. 2. Quantification les nanoplastiques seuls .....	99
III. 3. Répétabilité et limites de détection et de quantification .....	106
III. 4. Effets de matrice .....	108
III. 5. Bilan .....	111
<b>IV. Quantification des nanoplastiques par EA-IRMS</b> .....	<b>112</b>
IV. 1. Objectif .....	112
IV. 2. Calcul de la signature isotopique d'un mélange entre deux substances A et B .....	112
IV. 3. Simulations pour des nanoplastiques seuls et mélangés à la matrice organique .....	114
IV. 4. Etude préliminaire avec NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -11% .....	118
IV. 5. Développement de la méthode finale avec NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% .....	119
IV. 6. Bilan .....	125
<b>Conclusion</b> .....	<b>126</b>

## Introduction

Nous avons vu dans la partie bibliographique, que la quantification des nanoplastiques était encore un défi pour la communauté scientifique, en particulier dans des matrices complexes, comme des organismes vivants. Le marquage apparaît alors comme une solution adéquate pour permettre la quantification de nanoplastiques modèles en laboratoire. Parmi les techniques de marquage disponibles, le marquage isotopique est idéal puisqu'il permet de s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, que ce soit en termes de nature du polymère, de propriétés physico-chimiques ou de toxicité, tout en facilitant la détection. Dans le chapitre précédent, des nanoplastiques marqués au deutérium et au carbone  $^{13}\text{C}$  ont été synthétisés, et caractérisés, dans le but de servir de traceurs dans des études en laboratoire.

L'objectif de ce chapitre est de mettre en place les méthodes analytiques permettant de quantifier les nanoplastiques marqués au deutérium et au carbone  $^{13}\text{C}$ , dans des matrices organiques complexes, en vue de leur utilisation dans deux études écotoxicologiques présentées dans le Chapitre 4, visant à étudier l'accumulation des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* Deux techniques analytiques différentes ont été examinées : une première technique, couramment utilisée pour détecter les débris de plastiques, la Py-GC/MS et une méthode, recensée comme méthode de quantification des nanoplastiques dans une seule publication : l'EA-IRMS.

Le chapitre sera donc divisé en deux parties. La première partie présente la méthode de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie en Py-GC/MS, développée grâce à une calibration externe, pour les nanoplastiques NP- $(^2\text{H})_5$ -100% et les NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, dans la matrice *Daphnia magna* et *Artemia sp.* La répétabilité et les effets de matrice ont été étudiés et les limites de détection déterminées.

Dans la seconde partie, le potentiel de l'EA-IRMS pour quantifier les nanoplastiques a été examiné, de manière théorique, puis expérimentale. Un développement de méthode plus poussé a été réalisé sur les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ , en vue d'une quantification dans des artémias. La fiabilité de la méthode, ainsi que les limites de détection ont également été déterminées.

## I. Bibliographie

### I. 1. Py-GC/MS

#### I. 1. 1. Principe général

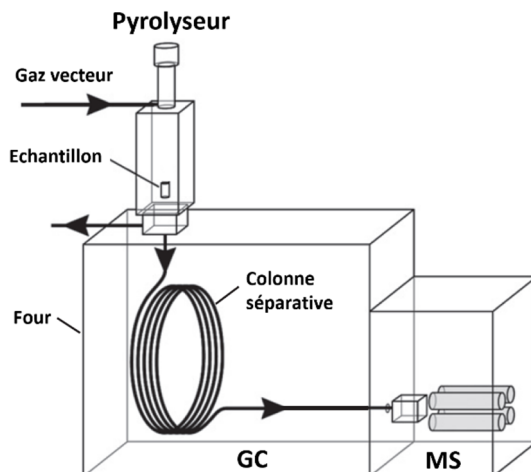


Figure 3.1: Schéma d'un pyrolyseur couplé à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Py-GC/MS). Adapté de Tsuge *et al.*<sup>172</sup>

La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Py-GC/MS) fait partie des techniques analytiques très utilisées pour la caractérisation des polymères et la quantification des micro- et nanoplastiques (*cf.* Chapitre 1 partie III. ). Le terme de Py-GC/MS comprend plusieurs types d'analyses, qui diffèrent sur certains points et qui seront détaillées dans la partie I. 1. 2. , ci-après. Cependant, le processus peut globalement être décomposé en 3 étapes.

La première étape est celle de la pyrolyse. Le terme de pyrolyse vient du grec  $\pi\tilde{\upsilon}\rho$ , « feu » et  $\lambda\upsilon\sigma\iota\varsigma$ , « délier », et désigne, de nos jours, la décomposition chimique sous l'action de la chaleur, généralement en absence d'oxygène. Pour cette étape, le but est donc de décomposer, à l'aide du procédé de pyrolyse, les molécules de l'échantillon à analyser, en différents fragments (molécules plus petites) appelés pyrolysats, tout en évitant la combustion complète de l'échantillon. Il existe différents types de pyrolyseurs, dont les spécificités ont été détaillées dans la partie I. 1. 3. , ci-après.

La deuxième étape, qui consiste à séparer les fragments produits par la pyrolyse, est effectuée par de la chromatographie en phase gazeuse. Les composés sont séparés en fonction de leur température d'ébullition (et donc généralement de leur taille) grâce à une colonne apolaire.

Enfin, la dernière étape consiste à détecter les fragments, après séparation. Cette étape est effectuée par un spectromètre de masse, qui assigne une masse à chaque composé. La détection des masses peut se faire sous deux modes différents : le mode SCAN permet de balayer toutes les masses sur une gamme choisie, qui peut être assez large, jusqu'à  $m/z=1000$  pour certains appareils. L'avantage de ce mode est qu'il permet de détecter toutes les molécules produites par un échantillon, ce qui est très utile pour les identifier et caractériser l'échantillon dans sa globalité. L'inconvénient est que le fait de chercher à détecter un grand nombre de masses prend du temps.

Le temps accordé pour chaque masse individuellement sera par conséquent plutôt court, et la sensibilité sera donc réduite. L'autre mode de détection des masses est appelé SIM (venant de l'anglais *Single Ion Monitoring*). Dans ce cas, seuls quelques ions spécifiques sont détectés, ce qui permet de consacrer plus de temps à ces ions d'intérêt et donc d'augmenter la sensibilité. En revanche, ce mode demande de connaître un minimum l'échantillon pour cibler les fragments d'intérêt. Il est donc déconseillé pour la caractérisation d'échantillons inconnus, mais peut être utile lors de la mise en place de méthode de quantification.

### I. 1. 2. Différents modes de pyrolyse des Py-GC/MS

La Py-GC/MS peut s'opérer sous différents modes, qui permettent d'obtenir des différents types de résultats, présentés Figure 3.2.

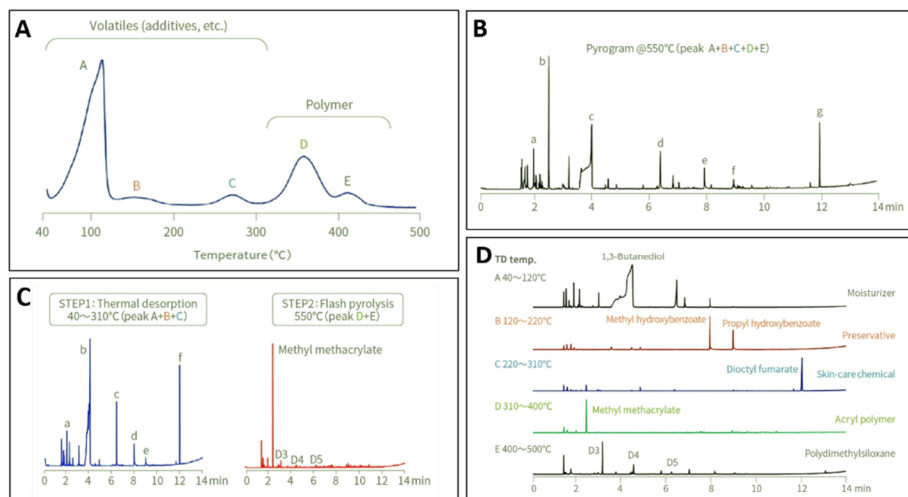


Figure 3.2: Exemple de thermogramme obtenu par analyse en mode *Evolved Gas Analysis* (A) et exemples de pyrogrammes obtenus à la suite d'analyses Py-GC/MS en mode *Single-shot* (B), *Double-shot* (C), *Heart-cutting* (D). Adapté des informations techniques fournies par Frontier Lab.<sup>173</sup>

#### I. 1. 2. 1. Evolved Gas Analysis

Le mode EGA (EGA-MS), de l'anglais *Evolved Gas Analysis*, permet d'obtenir un thermogramme (cf. Figure 3.2, A), c'est-à-dire une séparation globale des composés en fonction de leur température de dégradation. En effet, les échantillons sont introduits à faible température, et sont ensuite lentement chauffés, jusqu'à des hautes températures de pyrolyse. Les molécules rendues volatiles sont directement transférées dans le spectromètre de masse grâce à une colonne dénuée de phase stationnaire.<sup>125,174</sup>



### I. 1. 2. 2. *Single-shot*

Le mode *single-shot*, ou mode pyrolyse simple, en français, consiste à pyrolyser l'échantillon très rapidement à haute température (en mode isotherme), puis à séparer les fragments produits à l'aide d'une colonne apolaire, et d'une rampe en température, qui permettent une séparation des composés en fonction de leur température d'ébullition. On obtient donc un pyrogramme (cf. Figure 3.2, B), c'est-à-dire un chromatogramme des fragments produits par la pyrolyse en fonction leur temps d'éluion.<sup>125,174</sup>

### I. 1. 2. 3. *Double-shot*

Le mode *double-shot* ou TD-Py-GC/MS, ou désorption thermique suivie d'une pyrolyse, en français, est similaire au mode *single-shot*. Au lieu d'être pyrolysé directement à haute température, l'échantillon va tout d'abord subir une étape de thermodésorption (TD), c'est-à-dire être chauffé selon une rampe de température. Dans un second temps seulement, l'échantillon sera pyrolysé à haute température comme pour le mode *single-shot*. Deux pyrogrammes seront obtenus (cf. Figure 3.2, C). Le but de ce mode est d'analyser séparément les composés plus volatiles ou labiles, des composés plus difficiles à décomposer, comme les polymères.<sup>125,174</sup>

### I. 1. 2. 4. *Heart-cutting*

Le mode *heart-cutting* (HC/EGA-GC/MS), en anglais, ou désorption thermique multi-étapes, en français, permet de réaliser plusieurs pyrogrammes sur plusieurs gammes de température de désorption/pyrolyse choisies, pour un même échantillon (cf. Figure 3.2, D). Ce mode nécessite un équipement particulier : un piège froid et une interface qui permet l'introduction des composés en plusieurs fois. Cette technique permet de séparer des molécules qui seraient éventuellement coélueés, dans d'autres modes.<sup>125,174</sup>

### I. 1. 2. 5. *Thermochimiolyse analytique*

Cette technique consiste à dériver les macromolécules et/ou leurs fragments en ajoutant un agent dérivatisant puissant, généralement de l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH). Ce type de « pyrolyse » est appelé thermochimiolyse et peut être utilisé en combinaison avec d'autres modes thermiques, ou non. La thermochimiolyse est particulièrement utile pour l'analyse de polymères, ou fragments polaires, présentant des hydrogènes labiles.

### I. 1. 3. *Techniques de pyrolyse*

Il existe trois types de pyrolyseur, représentés dans la Figure 3.3 : les pyrolyseur à point Curie, les pyrolyseurs à filament et les pyrolyseurs à four thermique.

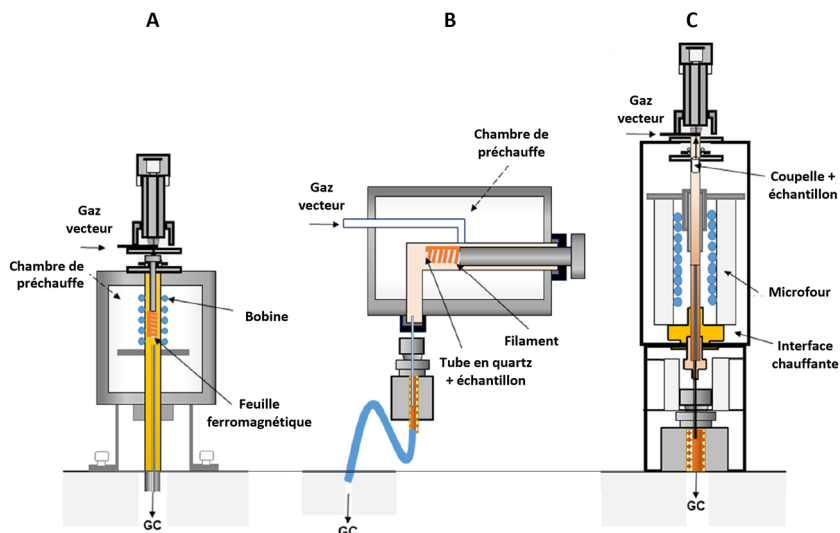


Figure 3.3: Schéma des différents types de pyrolyseurs actuellement sur le marché : pyrolyseur à point Curie (A), pyrolyseur à filament (B) et pyrolyseur à four thermique (C). Adapté de Picot et Braceló.<sup>174</sup>

### 1. 1. 3. 1. Pyrolyseur à point Curie

Dans un pyrolyseur à point Curie (cf. Figure 3.3, schéma A), aussi appelé pyrolyseur à induction, l'échantillon est placé dans une feuille composée de métaux ferromagnétiques (fer, cobalt, nickel par exemple), aussi appelée *pyrofoil*. Un champ électro-magnétique est appliqué à l'aide d'une bobine à hautes fréquences (radiofréquences). La température du matériau va alors augmenter jusqu'à la température Curie, température à laquelle le matériau ferromagnétique perd ses propriétés magnétiques. Cette technique a l'avantage de chauffer très rapidement, et de manière reproductible, puisque la température est liée à la composition des matériaux ferromagnétiques.

Chaque matériau, en fonction de leur composition en éléments ferromagnétiques, a un point-Curie spécifique. De ce fait, un des inconvénients de la technique est que le choix des températures de pyrolyse est limité par la variété des différents matériaux ferromagnétiques manufacturés. De plus, comme il n'est pas possible de faire varier la température de pyrolyse pour un même échantillon, on ne peut pas faire les injections en mode double-shot, EGA ou Heart-cut EGA.<sup>174</sup> Dans le commerce, ce type de pyrolyseur est représenté par différents fabricants tels que GCG Mess-Analysengeräte (Germany) ou Japan Analytical CO. Ltd. (Japan) avec, par exemple, leurs modèles Pyromat et JHS-3 respectivement.<sup>175,176</sup>

### 1. 1. 3. 2. Pyrolyseur à filament

Les pyrolyseurs à filament (cf. Figure 3.3, schéma B), aussi appelés *resistively heated filament pyrolyzers*, en anglais, chauffent les échantillons à l'aide d'un filament composé d'un matériau très résistant, comme du platine. Le filament peut prendre différentes formes suivant les systèmes : filament simple, ruban plat, bobine...<sup>177</sup> Un courant appliqué directement sur le filament le fera chauffer, grâce à l'effet Joule. Dans certains systèmes, l'échantillon peut être directement déposé sur le filament, ce qui permet une chauffe rapide et homogène. Cependant, pour l'analyse des micro et nanoplastiques notamment, l'échantillon est généralement placé dans un tube fin en quartz, qui est inséré à l'intérieur de la bobine.<sup>177</sup> Ce matériau supplémentaire va isoler l'échantillon, ce qui

peut entraîner un mauvais contrôle de la température, une chauffe plus lente et moins uniforme, et donc une mauvaise reproductibilité de la pyrolyse.<sup>174</sup> Pour limiter cet effet, le diamètre du tube et la quantité d'échantillon analysée sont réduits, ce qui peut être un inconvénient. En revanche, contrairement au pyrolyseur à point Curie, la température de pyrolyse ne dépend pas du matériau du filament ce qui donne accès à une large gamme de températures, la possibilité de faire varier la température et donc d'utiliser différents modes de pyrolyse tels que le mode EGA. Dans le commerce, ce type de pyrolyseur est représenté par le fabricant CDS Analytical (Etats-Unis), avec, par exemple, leur modèle Pyroprobe® 6150.<sup>178,179</sup>

### 1. 1. 3. 3. Pyrolyseur à four thermique

Dans un pyrolyseur à four thermique (cf. Figure 3.3, schéma C), l'échantillon est lâché ou déposé dans un four thermique déjà chauffé à la température souhaitée. Dans le système le plus utilisé actuellement (pour les micro- et nanoplastiques), le four thermique est un microfour vertical composé d'un tube en quartz entouré d'un système de chauffe en céramique, le tout enfermé dans un puissant isolant. Les échantillons sont placés dans une coupelle inerte. Avant l'injection, la coupelle est positionnée, à température ambiante, en attente, dans une première chambre alimentée en gaz vecteur (hélium), pour retirer toutes traces d'oxygène. Puis la coupelle est lâchée dans le tube en quartz du four, préalablement chauffé à la température souhaitée. Cette technique a plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet d'accéder à une grande gamme de températures et de modes de pyrolyse (Single Shot, Multi-shot, EGA, Heart-cut EGA). Ensuite, les coupelles utilisées pour mettre les échantillons peuvent avoir jusqu'à 80 µL de capacité, ce qui permet d'analyser des quantités plutôt élevées, bien que celles-ci doivent être quand même limitées pour une pyrolyse optimale (< 0,1 mg). En revanche, un des inconvénients de cette technique est le risque de pyrolyse secondaire : dû au large volume du microfour, des composés formés lors de la pyrolyse peuvent rencontrer la surface du four très chaude et se décomposer une deuxième fois. Pour diminuer ce risque, les pyrolyseurs à four thermiques fonctionnent avec des débits de gaz très élevés qui permettent de réduire le temps de résidence de l'échantillon dans le four. En revanche, ces hauts débits nécessitent des *split* élevés avant l'introduction dans la colonne. Dans le commerce, ce type de pyrolyseur est représenté par le fabricant FrontierLab (Japon), avec, par exemple, leur modèle 3030D.

### 1. 1. 4. Quantification du polystyrène non marqué et marqué à l'isotopie

#### 1. 1. 4. 1. Quantification du polystyrène non marqué

La détection et la quantification d'un polymère en Py-GC/MS sont réalisées en suivant des fragments produits par la pyrolyse de ce polymère, et ces fragments doivent lui être spécifiques. En ce qui concerne le polystyrène, le fragment majoritaire est le monomère styrène de masse  $m/z = 104$ , suivi, en termes de proportion, par le trimère de masse  $m/z = 312$ , puis le dimère de masse  $m/z = 208$  (voir spectre complet en Figure 3.5). Le monomère, plus abondant, a été utilisé pour quantifier des MP et des NP dans plusieurs publications.<sup>64,178</sup> Cependant, ce fragment n'est pas spécifique puisqu'en plus d'être produit par d'autres polymères tels que le PVC, il peut également être produit par des molécules présentes dans l'environnement, telles que la chitine, ainsi que d'autres matrices naturelles, potentiellement à cause de la présence de phénylalanine.<sup>126,175,180,181</sup>

Les dimères et trimères, quant à eux, sont bien spécifiques. Ils ont été utilisés en tant que marqueurs pour la quantification dans de nombreuses publications, recensées par Bouzid *et al.*, et Seeley et Lynch.<sup>125,126</sup> Plusieurs points sont cependant à prendre en considération. Tout d'abord, l'intensité de

ces deux fragments est très dépendante de la température de pyrolyse.<sup>182</sup> De plus, Lauschke *et al.* ont observé une réduction de la proportion des dimères et des trimères lors de la pyrolyse du poly(styrène) non marqué avec plusieurs matrices inorganiques (du sable nettoyé, du gel de silice, de la calcite (CaCO<sub>3</sub>), des filtres en alumine (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) broyé, de la montmorillonite et de la goethite). Dans le cas de l'alumine et du sable nettoyé, une diminution a aussi été observée pour le styrène, au profit du benzène et du  $\alpha$ -méthylstyrène, mais pas pour les autres matrices.<sup>183</sup> Enfin, et surtout, il a été montré que l'intensité des fragments dimères et des trimères (mais pas du monomère) pouvaient varier en fonction de la taille des particules analysées (dans la gamme 50 nm-10  $\mu$ m), ce qui remet complètement en question leur utilisation pour la quantifications de MP ou NP.<sup>127</sup>

Un autre fragment, le toluène ( $m/z=92$ ), peut également être considéré malgré une faible intensité, grâce à l'utilisation du toluène-styrène.<sup>183</sup> En effet, ce ratio est différent dans les échantillons environnementaux ( $R_{T/S}>4-5$ ) comparé aux échantillons de polystyrène ( $R_{T/S}<0,1$ ) en raison de la forte production du monomère styrène lors de la pyrolyse du PS. Contrairement au ratio dimère/styrène ou trimère/styrène, ce ratio ne varie pas de manière significative en fonction de la taille des particules analysées. Cette méthode permet de quantifier le polystyrène à des concentration assez élevées, mais doit encore être développée pour détecter des traces ou ultra-traces de nanoplastiques.<sup>127</sup>

#### I. 1. 4. 2. Quantification des polystyrènes marqués à l'isotopie

A notre connaissance, le marquage au carbone <sup>13</sup>C n'a encore jamais été utilisé, dans le cadre de la détection des débris plastiques en Py-GC/MS. En revanche, les polystyrènes deutérés, généralement le poly(styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>), parfois le poly(styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>), font partie des polymères utilisés en tant qu'étalons internes pour la quantification des MP et NP, comme mentionné dans différentes *review* et publications.<sup>125,126,183</sup>

Lauschke *et al.* ont étudié les effets de matrice lors de la pyrolyse du poly(styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>) (10  $\mu$ g, sous la forme de chaînes macroscopiques  $M_n=23300g.mol^{-1}$ , solubilisées dans du dichlorométhane à 1  $mg.mL^{-1}$ ), pour plusieurs types de matrices inorganiques : du sable nettoyé, du gel de silice, de la calcite (CaCO<sub>3</sub>), des filtres en alumine (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) broyés, de la montmorillonite, de la goethite. Tout d'abord, ils ont observé les mêmes variations en termes de fragments que pour le polystyrène non marqué. Concernant le fragment du styrène, ils ont également observé des échanges entre H et D, entraînant une diminution du nombre de fragments styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>, au profit d'autres fragments, de masses proches (entre  $m/z=102$  et  $m/z=112$ ), de manière différente suivant les matrices. Par cette publication, Lauschke *et al.* ont donc mis en évidence un fort effet de matrice pour des matrices inorganiques. En revanche, les auteurs ont précisé que pour des substances protiques tels de l'eau, du méthanol, ou des acides humiques, aucun effet de matrice n'a été observé.<sup>183</sup>

## I. 2. EA-IRMS

### I. 2. 1. Principe général de l'EA-IRMS

L'EA-IRMS est une technique de spectrométrie de masse permettant de mesurer la proportion entre certains isotopes stables d'éléments chimiques légers, généralement l'hydrogène, le carbone, l'azote, l'oxygène ou le soufre, d'un échantillon solide, parfois liquide. Cependant, contrairement à un spectromètre de masse classique, l'IRMS va quantifier un faible nombre de masses, mais de manière très spécifique et très précise. Pour cela, les molécules vont être converties en gaz simples :

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

H<sub>2</sub> pour l'hydrogène, N<sub>2</sub> pour l'azote, CO<sub>2</sub> pour le carbone, CO pour l'oxygène et SO<sub>2</sub> pour le soufre.<sup>184</sup> Dans le cas du carbone, la distinction se fera donc entre le <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> (m/z=44), le <sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> (m/z=45) et <sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sup>17</sup>O (m/z 46).

#### 1. 2. 2. Instrumentation

L'EA-IRMS est composé de trois éléments principaux, un analyseur élémentaire, une interface et un spectromètre de masse à rapport isotopique, schématisés, dans le cas de l'analyse du carbone, dans la Figure 3.4.

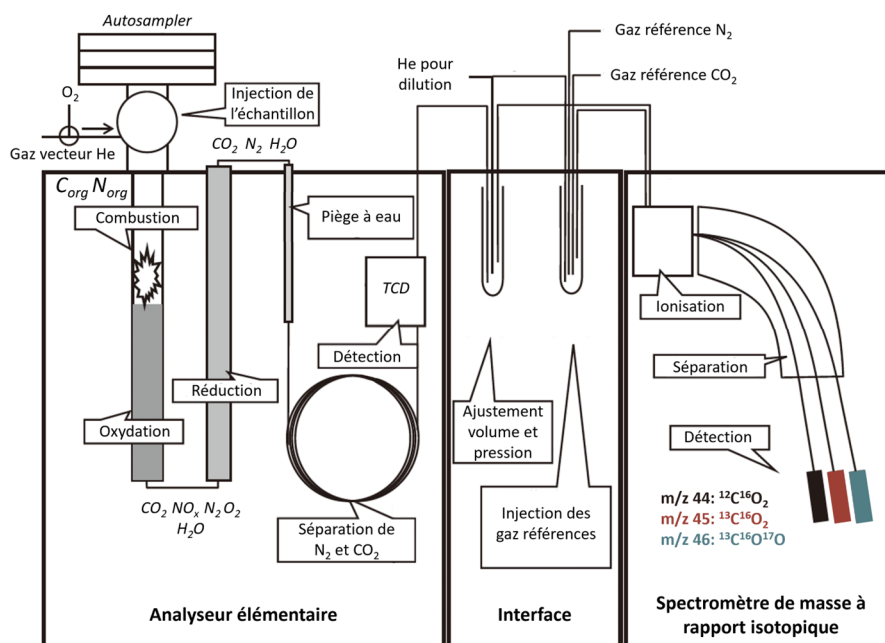


Figure 3.4: Schéma d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (EA-IRMS), dans le cas de l'analyse du carbone. Adapté de Ogawa *et al.*<sup>185</sup>

La conversion des molécules organiques de l'échantillon solide, en molécules gazeuses simples va avoir lieu dans l'analyseur élémentaire, à l'aide d'une étape de combustion, pour le carbone, l'azote et le soufre, ou d'une pyrolyse, pour l'oxygène et l'hydrogène. Dans le cas du carbone, le carbone organique est donc converti en CO<sub>2</sub>, dans un réacteur alimenté en gaz vecteur, additionné d'oxygène pour permettre l'oxydation de l'échantillon. Les molécules sont ensuite réduites dans un réacteur contenant du cuivre, qui permet de piéger l'oxygène en excès. L'eau est ensuite piégée par du perchlorate de magnésium anhydre. A la suite de ces étapes, les deux molécules restantes, le CO<sub>2</sub> et le N<sub>2</sub>, sont séparées à l'aide d'une colonne chromatographique et détectées, sans distinction isotopique, par un détecteur de conductivité thermique (TCD). Cet élément permet, entre autres, en connaissant la masse d'échantillon analysée, de déterminer le pourcentage en carbone et en azote.<sup>186</sup>

Les molécules passent ensuite par une interface qui permet de diluer si besoin les composés dans du gaz vecteur, ainsi que d'injecter les gaz de référence. Ce sont ces gaz, dont les rapports isotopiques sont connus et certifiés, qui permettent la quantification finale des isotopes.

Enfin, la détection des isotopologues a lieu dans l'IRMS. Les molécules sont ionisées, puis séparées en fonction de leur masse, à l'aide d'analyseur de type secteur magnétique. Cet analyseur utilise un champ électromagnétique, orienté perpendiculairement au faisceau d'ions, pour disperser les ions de masses  $m/z$  différentes de manière spatiale. La détection se fait ensuite par trois détecteurs différents, un pour chaque masse ciblée.<sup>18</sup>

### 1. 2. 3. Les notations de l'isotopie

Il existe trois façons différentes d'exprimer les compositions isotopiques d'une substance. La composition isotopique, également appelée signature isotopique, peut s'exprimer en **ratio isotopique**  $r$ , décrit dans le cas du carbone selon l'équation 2.4. Le ratio isotopique correspond au rapport entre le nombre d'atomes de l'isotope le plus lourd et le nombre d'atomes de l'isotope le plus léger.<sup>187</sup>

$$r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right) = \frac{n(^{13}\text{C})}{n(^{12}\text{C})} \quad 3.1$$

Une notation similaire est la **fraction isotopique**  $x$ . La fraction isotopique d'un isotope correspond au rapport entre le nombre d'atomes de cet isotope et la somme des atomes de tous les isotopes de cet élément. Par définition,  $x$  ne peut pas être supérieur à 1. Dans le cas du carbone, seuls les isotopes  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  sont pris en compte (cf. équation 3.2), étant donné les abondances non significatives des autres isotopes.<sup>187</sup>

$$x(^{13}\text{C}) = \frac{n(^{13}\text{C})}{n(^{12}\text{C}) + n(^{13}\text{C})} \quad 3.2$$

Enfin et surtout, la composition isotopique est fréquemment exprimée de manière relative, par rapport à un standard isotopique international. Dans le cas du carbone, il s'agissait à l'origine d'un matériel fossile du Crétacé, constitué de bélemnites provenant du site Pee Dee, en Caroline du Sud, appelé Pee-Dee-Belemnite (PDB), dont le ratio isotopique du carbone a été mesuré en 1957 à  $r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Std} = 0,0112372$ . Depuis, cette valeur est devenue une référence théorique appelée Vienna Pee-Dee-Belemnite (V-PDB).<sup>188</sup> On peut donc exprimer la composition isotopique en  $\delta^{13}\text{C}$ , en fonction du ratio isotopique (cf. l'équation 3.3) ou en fonction de la fraction isotopique (cf. l'équation 3.4). A noter que, bien que le résultat n'ait pas de dimension, on exprime généralement le  $\delta^{13}\text{C}$  en ‰, afin de mettre en valeur de très faibles variations, potentiellement détectables en IRMS.<sup>187</sup>

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Ech} - r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Std}}{r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Std}} = \frac{r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Ech}}{r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Std}} - 1 \quad 3.3$$

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{x(^{13}\text{C})_{Ech}}{(1 - x(^{13}\text{C})_{Ech}) * r\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{Std}} - 1 \quad 3.4$$

### 1. 2. 4. Isotopie du carbone et fractionnement isotopique

Le carbone possède trois principaux isotopes, deux isotopes stables : le carbone  $^{12}\text{C}$ , le plus abondant, et le carbone  $^{13}\text{C}$ , ainsi qu'un isotope radioactif le carbone  $^{14}\text{C}$ , mais présent en si petite quantité qu'il n'est pas détectable par IRMS. L'abondance naturelle du carbone  $^{13}\text{C}$  est donnée, en fraction isotopique, à  $x(^{13}\text{C})_{\text{nat}} = 0,0107$ , avec celle du  $^{12}\text{C}$  à  $x(^{12}\text{C})_{\text{nat}} = 0,9893$ .<sup>189</sup>

Ces données sont en réalité des moyennes puisque la composition isotopique (pour le carbone, mais aussi pour les autres éléments) des composés peut varier lors de phénomènes appelés fractionnements isotopiques, ayant lieu lors de réactions chimiques, physiques ou biologiques. Certaines réactions vont préférentiellement mettre en jeu des isotopes plus légers, ou plus lourds, pour des raisons de thermodynamique ou de cinétique de réaction, créant ainsi des variations dans la répartition des isotopes. Par exemple, les isotopes les plus lourds sont favorisés dans les produits oxydés. Au contraire, lors de la plupart des processus biologiques, les isotopes légers sont généralement favorisés, car ils demandent moins qu'énergie. A noter, que les fractionnements isotopiques sont favorisés à basse température, puisqu'à haute température, les différences entre les isotopes sont atténuées.<sup>190</sup>

Dans l'environnement, des variations de signatures isotopiques permettent de différencier les plantes dites  $\text{C}_3$  ( $\delta^{13}\text{C} \approx -28\text{‰}$ ), qui incorporent le  $\text{CO}_2$  en une fois via le cycle de Calvin, et les plantes dites  $\text{C}_4$  ( $\delta^{13}\text{C} \approx -12\text{‰}$ ), qui l'incorporent une première fois via le cycle de Hatch-Slack, puis une deuxième fois, via le cycle de Calvin. Parmi les plantes  $\text{C}_4$ , on trouve des espèces adaptées aux climats chauds et secs, telles que le maïs ou la canne à sucre, alors que la plupart des autres plantes ont une photosynthèse de type  $\text{C}_3$ . C'est le cas du blé, du riz, de la pomme de terre de l'avoine ou encore le coton.<sup>186,190,191</sup> En ce qui concerne le pétrole, on observe des  $\delta^{13}\text{C}$  entre -17 et -44 ‰, avec par exemple, un matériau de référence certifié à la signature isotopique de -30,03 (NBS22).<sup>192</sup>

### 1. 2. 5. EA-IRMS et débris plastiques

#### 1. 2. 5. 1. Débris non marqués

A cause des variations isotopiques expliquées précédemment, les analyses isotopiques sont depuis longtemps utilisées pour suivre l'origine de substances, par exemple, dans le domaine de l'alimentaire, pour vérifier l'authenticité de certains produits, ou encore, dans la police scientifique.<sup>184,188</sup> Concernant les plastiques, l'EA-IRMS peut être utilisée pour différencier les plastiques biosourcés de ceux issus de la pétrochimie. En 2010, Suzuki *et al.* ont montré des différences significatives entre les plastiques issus de plantes  $\text{C}_4$  (maïs et cannes à sucre), avec des  $\delta^{13}\text{C}$  compris entre -10 et 17,3‰, et ceux issus de produits du pétrole ou de plantes  $\text{C}_3$ , ayant des  $\delta^{13}\text{C}$  compris supérieurs à 25‰.<sup>191</sup> Berto *et al.* ont aussi analysé, par EA-IRMS, différents plastiques, à l'aide d'un EA-IRMS. De la même façon, ils ont montré des différences de signatures isotopiques entre certains plastiques biosourcés et ceux issus de la pétrochimie. Dans cette étude, les auteurs ont également observé une variation du  $\delta^{13}\text{C}$  en fonction du vieillissement des plastiques, les plastiques neufs étant plus riches en carbone  $^{13}\text{C}$  d'environ 2 ‰, comparés aux plastiques vieilliss.<sup>190,193</sup> Des résultats similaires ont été observés par Birch *et al.* après vieillissement de différents types de plastiques. Les auteurs ont aussi relevé des différences en fonction de l'origine géographique des plastiques, et de leur mode de fabrication (plastiques recyclés ou non).<sup>194</sup>

### I. 2. 5. 2. Nanoplastiques marqués

En termes de débris marqués, comme mentionné dans le Chapitre 1, partie IV. 4., une seule étude reporte avoir eu recours à l'EA-IRMS pour quantifier des nanoplastiques modèles marqués à l'aide d'isotopes stables. Dans leurs travaux, Murazzi *et al.* ont synthétisé à partir de styrène- $(^{13}\text{C})_8$  des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ , d'environ 30 nm de diamètre, qu'ils ont ensuite quantifié dans des racines de jeunes arbres pour étudier leur transport. Au travers de cette étude, Murazzi *et al.* ont mis en évidence un enrichissement, significatif, en carbone  $^{13}\text{C}$  de la partie immergée des racines (et donc directement exposée), après un jour d'exposition, pour les trois espèces étudiées. Un enrichissement a aussi été observé, pour l'une des espèces, au niveau de la tige, ce qui indique un transport des nanoplastiques depuis les racines vers le reste de la plante, *via* le xylème. Si les conclusions sont sans appels, en termes de quantification des réserves peuvent être émises quant à la méthode de calcul utilisée, qui fait l'approximation entre la fraction massique de  $^{13}\text{C}$  par rapport au carbone total, et  $x(^{13}\text{C})$  qui correspond à la fraction molaire entre le carbone  $^{13}\text{C}$  et le carbone total. Néanmoins, cette publication montre bien le potentiel que peut avoir le marquage au carbone  $^{13}\text{C}$ , associé avec une analyse en EA-IRMS.<sup>154</sup>

## II. Matériels et méthodes

### II. 1. Matériels

Le développement de la méthode de quantification par Py-GC/MS a été fait à l'aide de nanoplastiques non marqué ( $\text{NP}_{\text{nat}}$ ) et de quatre types de nanoplastiques marqués, deux au carbone  $^{13}\text{C}$  : ( $\text{NP}-(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%, et  $\text{NP}-(^{13}\text{C})_{\delta}$ -100%), et deux au deutérium ( $\text{NP}-(^2\text{H})_5$ -100% et  $\text{NP}_{\text{TA}}-(^2\text{H})_8$ -100%). Les conditions de synthèse des particules sont décrites dans le Chapitre 2, partie II. 2. 1. Les  $\text{NP}_{\text{TA}}-(^2\text{H})_8$ -100% ont la particularité d'avoir été synthétisés à l'aide de tensioactifs, contrairement aux autres polymères. Pour le développement de la méthode de quantification par EA-IRMS, seuls les nanoplastiques non marqués, et ceux marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ , ont été utilisés.

Trois types de matières organiques modèles ont été utilisés : de l'acide humique (International Humic Substance Society), de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich) et d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich). Des matrices biologiques plus complexes ont aussi été testées : *Daphnia magna*, *Artemia Salina* et *Mytilus edulis*. Les daphnies ont été éclos au laboratoire à partir d'œufs dormants (éphippies) fournis par les Daphtoxkits (Daphtoxkit F™, MicroBioTests Inc., Belgique). Avant analyse, elles ont été séchées directement dans les coupelles de pyrolyse. Les artémias ont été fournies par les laboratoires de l'environnement de l'IAEA (Monaco, Principauté de Monaco), directement lyophilisées. Elles ont ensuite été broyées avant d'être utilisées pour le développement des méthodes par Py-GC/MS ou EA-IRMS.

Pour le développement de la méthode par Py-GC/MS, l'effet des sels a été étudié à l'aide de chlorure de sodium (Sigma-Aldrich) et d'eau douce de référence, adaptée pour les daphnies, selon la norme ISO 6341, et avec les sels fournis dans les Daphtoxkits (Daphtoxkit F™, MicroBioTests Inc., Belgique).



## II. 2. Méthodes

### II. 2. 1. Py-GC/MS

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un pyrolyseur Frontier Lab 3030D (Frontier Lab, Japon), équipé de l'auto-Shot Sampler AS-1020E (Frontier Lab, Japon), directement couplé à un GC/MS. Deux appareils différents ont été utilisés. Le développement de méthode a été fait majoritairement à l'aide d'un GC/MS Agilent 5977B (Agilent Technologies). Les droites d'étalonnage et le calcul des limites de détection (LD) et limites de quantification (LQ) ont été faits à l'aide d'un pyrolyseur 3030D (Frontier Lab, Japon) couplé à un GC/MS Schimadzu QP2010 SE (Schimadzu, Japan). Les échantillons ont été placés dans des coupelles en acier inoxydable désactivé (Eco-Cup LF, 80 µL, Frontier Lab, Saikon, Japon) et séchés de toute eau résiduelle avant analyse.

Tous les paramètres techniques utilisés ont été présentés dans l'Annexe 1. Brièvement, et sauf précision contraire, les échantillons ont été pyrolysés à 500°C pendant 1 min, suivi d'une injection en mode *split* (1 :50). Les pyrolysats ont été séparés à l'aide d'une colonne apolaire (DB5-HT, 30 m x 0,25mm, 0,25µm, Agilent Technologies). La température du four a été programmée à 50°C pendant 2,5 min, augmentée jusqu'à 320°C avec une rampe de 10°C.min<sup>-1</sup>, puis stabilisée à 320°C pendant 4 min. Sauf mention contraire, la détection des nanoplastiques pour le développement de méthode a été faite en mode SCAN, (m/z : 40-350). Pour les droites d'étalonnage et le calcul des LD, l'analyse a été faite en mode SIM, pour suivre les marqueurs des nanoplastiques.

Les calibrations ont été préparées en transférant, dans les coupelles de pyrolyse, 30 µL de solutions diluées de nanoplastiques marqués, (neuf concentrations différentes comprises entre 0,8 ppm et 100 ppm), et en les séchant sur une plaque chauffante, à 50°C, pendant 2 h. On obtient donc des gammes de calibration comprises entre 24 ng et 3 µg de nanoplastiques.

### II. 2. 2. EA-IRMS

Les signatures isotopiques en carbone des échantillons ont été obtenues à l'aide d'un analyseur élémentaire Flash HT couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique IRMS Delta V Plus, via l'interface ConFlo IV (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Les échantillons ont été placés dans des nacelles d'étain (étain léger, 5 x 9mm, IVA Analysentechnik, Meerbusch, Allemagne), et ont été brûlés dans une unité de combustion maintenue à 900°C, avant injection via un flux d'hélium additionné d'oxygène. Les analyses isotopiques <sup>13</sup>C ont été effectuées à l'aide des signaux collectés sur les masses 44, 45 et 46 de l'IRMS. Des matériaux de référence certifiés, ainsi que des matériaux de référence internes (pour les enrichissements très hauts en <sup>13</sup>C) ont été utilisés pour vérifier la justesse et la précision des résultats. La liste et les caractéristiques de ces matériaux sont présentés en Annexe 2.

A noter que les analyses reportées dans ce manuscrit ont été faites avec le même type d'appareil mais dans deux laboratoires différents : à l'Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux (IPREM) pour la partie IV. 4. , et l'Institut des sciences analytiques (ISA) pour la partie V. 5 et pour les analyses de l'étude présentée dans le Chapitre 4 partie IV.

Les analyses de carbone total (%C) ont été effectuées sur un analyseur carbone/hydrogène (ISA, CNRS France). Les échantillons ont été prélevés et pesés de l'ordre du mg, dans des capsules d'argent (Lüdi 3.2X6 mm). Ils ont été brûlés dans une unité de combustion verticale comprenant un four

supérieur porté à 1050 °C et un four inférieur à 850 °C, garni d'oxyde de cuivre et alimenté par un flux de 95 ml/min en O<sub>2</sub>. Le carbone de l'échantillon, transformé en dioxyde de carbone, a été mesuré sur un détecteur infrarouge Rosemount NGA 2000. L'étalonnage a été effectué à l'aide de matériaux de référence certifiés, présentés en Annexe 2.

Afin de déterminer la signature isotopique des NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, un *fit* a été appliqué sur les données, à l'aide du logiciel OriginLab), selon l'équation appropriée (cf. partie V. 5).

### III. Quantification des nanoplastiques par Py-GC/MS

#### III. 1. Objectif

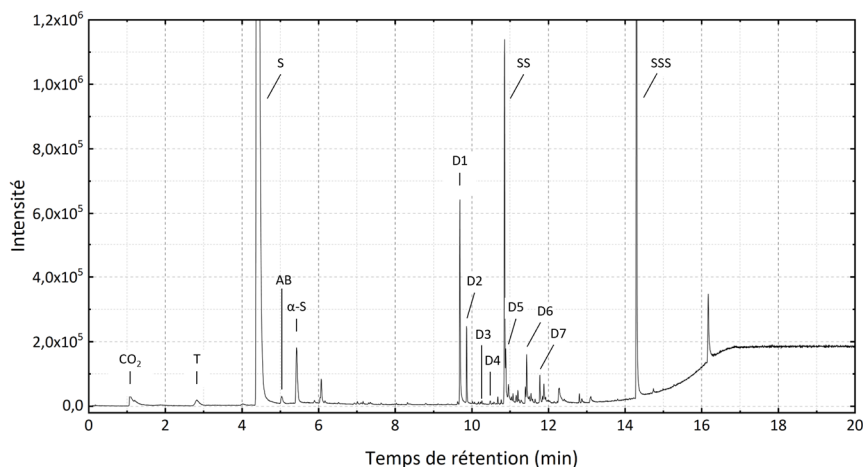
Nous avons vu dans la partie I. 1. 4. 1 que la quantification, par Py-GC/MS, du polystyrène non marqué, était remise en question, à cause de la non-spécificité du fragment styrène, (qui est aussi produit lors de la pyrolyse de nombreuses matrices, organiques et inorganiques), et à cause de variations d'intensité des fragments dimères et trimères en fonction de la taille des particules analysées.

L'objectif ici est donc de développer une méthode d'analyse permettant de quantifier des nanoplastiques marqués au deutérium ou au carbone <sup>13</sup>C, dans des matrices organiques complexes. Pour cela, les nanoplastiques ont été analysés seuls afin d'identifier les fragments spécifiques permettant de les suivre et de choisir la température de pyrolyse optimale. Une fois ces paramètres choisis, des solutions de calibrations ont été analysées afin de vérifier la linéarité des réponses pour les différents types de nanoplastiques. La répétabilité des analyses a été vérifiée et les limites de détection et de quantification ont été calculées. Pour finir, les effets de matrice ont été étudiés pour s'assurer que la méthode soit fiable, y compris en présence d'interférents comme de la matière organique ou des sels.

#### III. 2. Quantification les nanoplastiques seuls

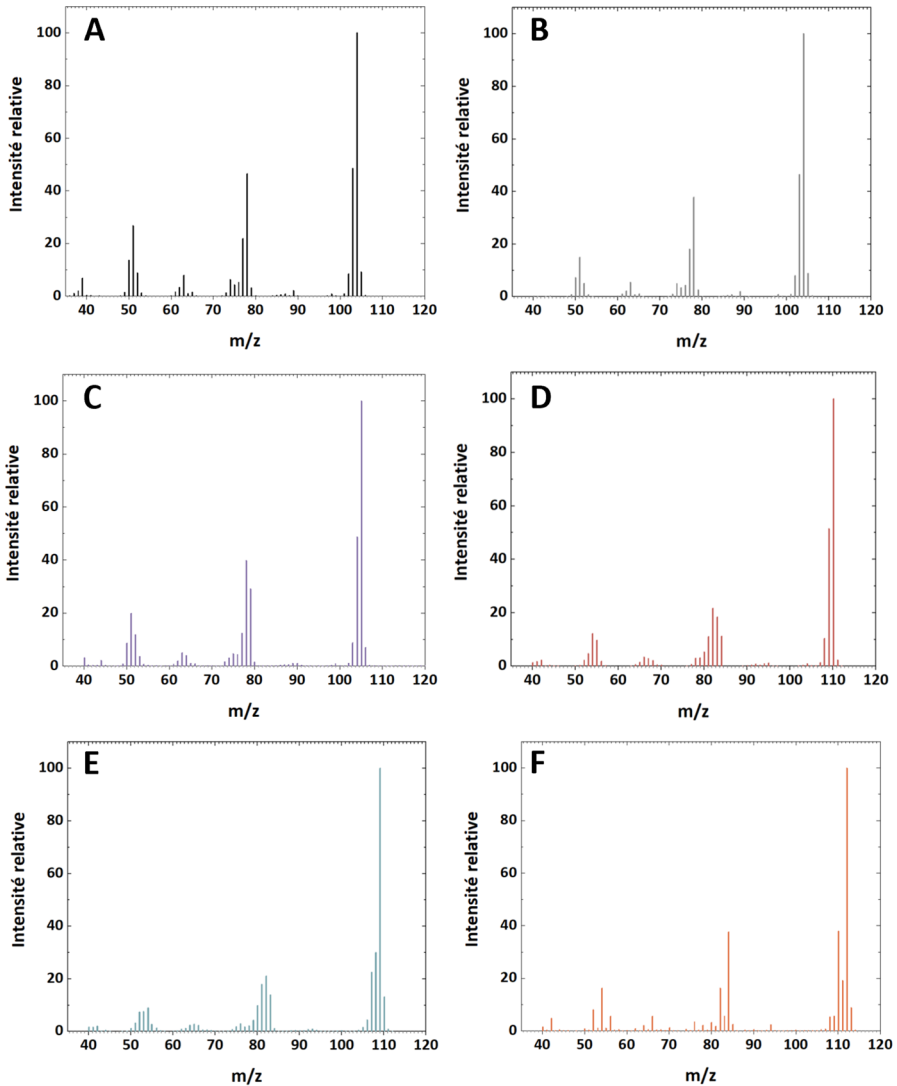
##### III. 2. 1. Choix du fragment suivi

Les nanoplastiques non enrichis (NP<sub>nat</sub>) ont d'abord été analysés par pyrolyse. Le pyrogramme obtenu est présenté dans la Figure 3.5. On retrouve des fragments identifiés par Tsuge *et al.* pour le polystyrène, les trois principaux étant le monomère (styrène, S), le trimère (SSS) et le dimère (SS), par ordre d'intensité.<sup>172</sup>



**Figure 3.5:** Pyrogramme des nanoplastiques non marqués NP<sub>nat</sub> (en courant ionique total, TIC), réalisé à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B). Notations des fragments détaillées en Annexe 3.

Pour les nanoplastiques marqués, le pyrogramme total est similaire (données non montrées), avec des décalages en masse pour certains fragments, dus à la présence des isotopes plus lourds. Comme pour le polymère non marqué, le fragment de monomère (styrène) est le fragment majoritairement produit. Pour cette raison et parce qu'il est moins sujet à fluctuation comme le dimère et le trimère,<sup>127,183</sup> le styrène est un fragment de choix à suivre pour la quantification. Les pics de styrène ont donc été étudiés plus précisément, au travers de leurs spectres de masse, pour les différents types de nanoplastiques marqués et comparés avec ceux des nanoplastiques non marqués. Ces résultats sont présentés dans la Figure 3.6. Les intensités relatives des fragments de masses comprises entre 101 et 114 ont également été détaillées dans le Tableau 3.1.



**Figure 3.6:** Spectres de masse en intensité relative du styrène de la base de donnée NIST (A, noir) ou du pic du styrène (au temps de rétention de 4,5 min) obtenu par l'analyse des nanoplastiques non marqués NP<sub>nat</sub> (B, gris) ou marqués : NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (C, violet), NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (D, rouge), NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (E, bleu) et NP-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (F, orange). 1,5 µg de nanoplastiques analysés, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN.

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

**Tableau 3.1:** Intensités relatives (en pourcentage) des fragments de masses comprises entre 101 et 114, calculées à partir des aires des pics, par rapport à l'aire la plus intense. 1,5 µg de nanoplastiques analysés, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN.

m/z	Non marqué	Marquage au carbone <sup>13</sup> C		Marquage au deutérium	
	NP <sub>nat</sub>	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>β</sub> -100%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>ε</sub> -100%	NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%	NP <sub>Tα</sub> -( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> -100%
101	0,8	0	0	0,06	0
102	7,8	0,7	0	0,04	0,1
103	46,1	8,7	0,3	0,11	0
104	<b>100</b>	48,6	0,9	0,44	0,1
105	8,7	<b>100</b>	0,2	1,5	0,1
106	0,3	7,0	0,1	4,4	0,5
107	0	0	1,2	22,6	0,6
108	0	0,01	10,2	29,8	5,3
109	0	0	51,2	<b>100</b>	5,3
110	0	0	<b>100</b>	13,0	37,8
111	0	0	2,2	0,8	19,0
112	0	0	0	0	<b>100</b>
113	-	-	-	-	8,7
114	-	-	-	-	0,3

La Figure 3.6 permet tout d'abord de confirmer l'identification du pic étudié (temps de rétention 4,5 min) grâce à la très bonne correspondance entre le spectre de masse du pic de styrène obtenu par la pyrolyse des NP<sub>nat</sub> (cf. Figure 3.6, B) avec celui de la base NIST (cf. Figure 3.6, A). Dans le cas des nanoplastiques marqués, les spectres de masse ont globalement la même allure, avec des décalages en masse vers des masses plus élevées, dus à la présence des isotopes plus lourds.

Pour les nanoplastiques non marqués, le pic le plus intense est bien celui du styrène à la masse m/z=104. Cependant, des fragments ont aussi été détectés aux masses les plus proches (m/z = 102, 103 et 105), avec des intensités relatives assez importantes (7,8 ; 46,1 et 8,7, respectivement, cf. Tableau 3.1). On peut expliquer la présence d'un pic du styrène à la masse m/z=105, si l'un des carbones est un carbone <sup>13</sup>C (l'abondance du deutérium étant très faible, la présence d'un atome de deutérium est négligeable). En connaissant l'abondance du carbone <sup>13</sup>C, on peut obtenir la probabilité d'avoir un carbone <sup>13</sup>C sur les 8 carbones du styrène, via une loi binomiale (cf. équation 3.5). L'abondance naturelle moyenne du carbone <sup>13</sup>C est de 1,07%, cependant il peut y avoir des variations suivant les origines des substances notamment. Nous avons analysé des nanoplastiques non marqués en EA-IRMS pour le développement de la méthode de quantification, et nous avons obtenu un pourcentage de carbone <sup>13</sup>C de 1,0776%. L'équation 3.5 a donc été utilisée avec les paramètres suivants : k=1, n=8, p=0,010776. On obtient une probabilité de 8,0% (correspondant à la fraction entre les deux pics), ce qui nous donnerait un pic d'intensité relative (en ratio par rapport au styrène de masse m/z=104) de 8,7%, ce qui correspond exactement à la valeur obtenue expérimentalement.

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k (1 - p)^{n-k} \quad 3.5$$

Avec :

- $P(X=k)$  : probabilité de k succès
- $\binom{n}{k}$  : coefficient binomial correspondant au nombre de combinaisons possibles
- k : nombre de succès
- n : nombre d'expériences
- p : probabilité de succès

Les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>β</sub>-100%, après pyrolyse, produisent majoritairement un pic de styrène enrichi avec un atome de  $^{13}\text{C}$ , soit à une masse  $m/z=105$ . On retrouve d'autres pics aux masses les plus proches :  $m/z= 103, 104$  et  $106$ , avec des intensités relatives de  $8,7 ; 48,6$  et  $7,0\%$  (cf. Tableau 3.1).

Après pyrolyse du nanoplastique NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, on obtient le pic majoritaire de styrène enrichi par 6 atomes de carbone  $^{13}\text{C}$ , soit à une masse  $m/z=110$ . On retrouve d'autres pics aux masses les plus proches :  $m/z= 108, 109$  et  $111$ , avec des intensités relatives de  $10,2 ; 51,2$  et  $2,2\%$  (cf. Tableau 3.1). On observe une réduction du pic à  $M+1$  (où  $M$  est la masse du fragment majoritaire), ce qui est cohérent, puisque six des 8 carbones ont été remplacés par des carbones  $^{13}\text{C}$ . On peut recalculer la probabilité pour que l'un des deux carbones restants soit un carbone  $^{13}\text{C}$  en utilisation l'équation avec les paramètres suivants :  $k=1, n=2, p=0,010776$ , et on obtient dans ce cas-là, une probabilité de  $2,1\%$  et donc un pic  $m/z=111$  d'intensité relative de  $8,7\%$ .

Pour l'analyse des NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%, on obtient un pic majoritaire de styrène enrichi par 5 atomes de deutérium, soit à la masse  $m/z=109$ . On détecte aussi des fragments à d'autres masses (notamment à des masses inférieures)  $m/z= 106, 107, 108$  et  $110$  avec des intensités relatives de  $4,4 ; 22,6 ; 29,8$  et  $13,0\%$  (cf. Tableau 3.1). Lauschke *et al.* ont aussi observé un décalage vers les masses plus faibles, lors de la pyrolyse du poly(styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>), lors de l'analyse du polymère seul, et de manière accentuée lors de l'analyse en présence de matrice inorganique. Dans leur publication, ils ont attribué ce décalage de masses à un échange entre hydrogènes et deutériums, qui aurait lieu lors de l'ionisation.<sup>183</sup> On remarque que l'intensité relative du fragment à la masse  $M+1$  est plus haute que pour les nanoplastiques non marqués, ce qui aurait tendance à confirmer l'hypothèse d'un échange entre  $^1\text{H}$  et  $^2\text{H}$ , puisque, dans ce cas-là, en plus du fragment « enrichi » avec le carbone  $^{13}\text{C}$  « naturel », on aurait à la même masse  $m+1$  le fragment enrichi par un 6<sup>ème</sup> atome de deutérium.

La pyrolyse du NP-TA-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100% a produit majoritairement du styrène enrichi par 8 atomes de deutérium, soit un fragment de masse  $m/z=112$ . Comme pour les autres nanoplastiques, on détecte aussi d'autres fragments aux masses :  $m/z= 108, 109, 110, 111$  et  $113$ , aux intensités relatives de  $5,3 ; 5,3 ; 37,8 ; 19,0$  et  $8,7\%$  (cf. Tableau 3.1). On retrouve les  $8,7\%$  d'intensité relative à la masse  $M+1$ , comme pour les nanoplastiques non enrichis, que l'on peut de nouveau attribuer à l'abondance naturelle du carbone  $^{13}\text{C}$ .

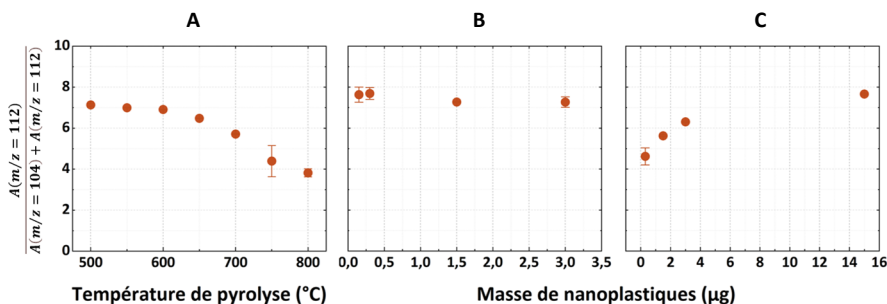
Pour résumé, ces analyses ont permis de choisir les fragments permettant de suivre chaque nanoplastique en Py-GC/MS, c'est-à-dire les fragments de masse  $m/z=105$  pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>β</sub>-100%,  $m/z=110$  pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%,  $m/z=109$  pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et  $m/z=112$  pour les NP-TA-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100%.

### III. 2. 2. Choix de la température de pyrolyse

Plusieurs tests visant à étudier l'influence de la température de pyrolyse ont été réalisés à l'aide des nanoplastiques NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11%. Ces derniers ont été synthétisés avec 11% de styrène-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub> et 89% de

## CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

styrène non marqué. En calculant la fraction de l'aire du pic de masse  $m/z=112$ , par rapport à l'aire du fragment de masse  $m/z=104$ , on peut obtenir la proportion de styrène- $(^2\text{H})_8$  polymérisé, en comparaison au styrène non marqué. Après pyrolyse, on devrait donc retrouver de manière répétable, cette proportion de styrène- $(^2\text{H})_8$  polymérisé.



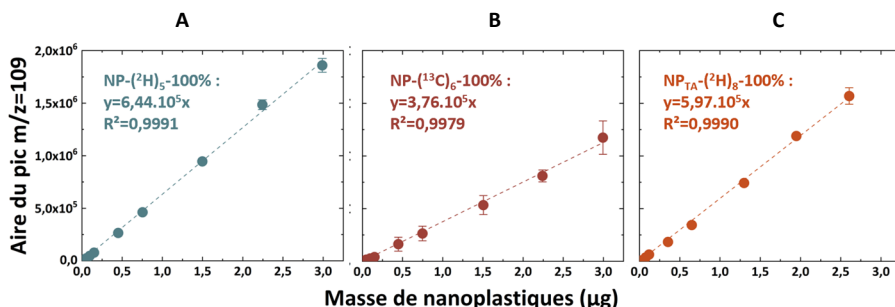
**Figure 3.7:** Fraction du fragment styrène- $(^2\text{H})_8$  de masse  $m/z=112$ , en pourcentage par rapport au styrène de masse  $m/z=104$ , en fonction de la température de pyrolyse (A), de la masse de nanoplastiques analysés, à 500°C et *split* 1:50 (B), à 700°C et *split* 1:100 (C), à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B).

Au travers de la Figure 3.7, on peut voir l'impact que la température de pyrolyse a sur la proportion des fragments produits et donc sur le résultat du pourcentage de styrène- $(^2\text{H})_8$  produits. Dans le graphique A, on voit que ce pourcentage est constant pour les températures les plus faibles, alors qu'il baisse pour les températures les plus hautes à partir de 600 °C. De même, lorsque l'on analyse différentes masses de nanoplastiques, on obtient un résultat constant, après pyrolyse à 500°C, alors qu'on observe de grosses variations à 700°C. Il semble donc qu'à partir de 600°C, la pyrolyse des nanoplastiques ne permet pas d'obtenir des résultats quantitatifs. Ceci pourrait être expliqué par la dégradation du polystyrène à haute température, comme cela a été observé à plusieurs reprises à partir de 650°C.<sup>127,195</sup> Pour la suite de ces travaux, il a été décidé, au vu de ces résultats, de réaliser les analyses avec une température de pyrolyse de 500°C. En ce qui concerne le *split*, afin d'atteindre des concentrations les plus basses, tout en restant des conditions optimales pour la colonne, un *split* de 1:50 a été choisi, pour le reste des analyses.

### III. 2. 3. Quantification par étalonnage externe

Le développement de méthode a été fait plus précisément pour trois types de nanoplastiques marqués : NP- $(^2\text{H})_5$ -100%, NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% et NP<sub>TA</sub>- $(^2\text{H})_8$ -100%. Les NP<sub>TA</sub>- $(^2\text{H})_8$ -100% ont la particularité d'avoir été synthétisés à l'aide de tensioactifs, contrairement aux deux autres polymères. Des calibrations, sur une gamme de masses de nanoplastiques comprises entre 24 ng et 3 µg, ont été réalisées pour tester la linéarité et il a été choisi de suivre le fragment majoritaire de chaque nanoplastique, soit les fragments de styrènes marqués, de masses  $m/z=109$ , 110 et 112, pour les échantillons NP- $(^2\text{H})_5$ -100%, NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% et NP<sub>TA</sub>- $(^2\text{H})_8$ -100% respectivement. Les droites de calibration résultantes sont représentées dans la Figure 3.8, et les résidus sont présentés dans l'Annexe 4. Nous avons vu dans la partie III. 1. que d'autres fragments de masses proches de celle du monomère marqué étaient aussi produits. Afin de vérifier que le fragment choisi est bien représentatif des nanoplastiques sur toute la gamme de calibration, l'intensité de ces fragments a été étudiée après pyrolyse de différentes quantités de nanoplastiques. Ces résultats sont détaillés dans le Tableau 3.2.

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotope



**Figure 3.8:** Calibrations pour NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (A-bleu), NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (B-rouge), NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (C-orange), avec suivi des fragments de styrène marqué majoritaire de masse m/z=109, 110 et 112, respectivement. Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Shimadzu (GCMS-QP2010 SE), en mode SIM, en triplicat pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% et en duplicat pour les NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100%.

**Tableau 3.2:** Intensité relative des fragments de styrène (en pourcentage, par rapport à l'aire la plus intense) en fonction de la masse de nanoplastiques analysée pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (A, avec m/z compris entre 104 et 111), les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (B, avec m/z compris entre 106 et 111) et les NP<sub>TA</sub>-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (C, avec m/z compris entre 107 et 114). Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN.

<b>A</b>		<i>Masse de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (µg)</i>			
<b>m/z</b>	<b>0,1</b>	<b>0,45</b>	<b>1,5</b>	<b>3,0</b>	
104	0,9	0,7	0,5	0,4	
105	1,5	1,9	1,5	1,5	
106	4,5	5,8	4,3	4,3	
107	22,6	24,5	22,7	22,6	
108	30,9	34,8	30,8	29,8	
109	100	100	100	100	
110	12,7	12,8	12,9	13,3	
111	0,7	0,8	0,8	0,8	
<b>B</b>		<i>Masse de NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (µg)</i>			
<b>m/z</b>	<b>0,1</b>	<b>0,45</b>	<b>1,5</b>	<b>3,0</b>	
106	0	0	0,1	0	
107	1,2	1,2	1,2	1,3	
108	10,3	10,2	10,2	10,5	
109	51,0	50,8	51,2	51,9	
110	100	100	100	100	
111	2,1	2,2	2,2	2,2	
<b>C</b>		<i>Masse de NP-TA-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>-100% (µg)</i>			
<b>m/z</b>	<b>0,15</b>	<b>0,45</b>	<b>1,5</b>	<b>3,0</b>	
107	0,5	0,7	0,6	0,5	
108	0,7	1,2	5,3	0,6	
109	5,4	7,3	5,3	5,4	
110	37,2	39,2	37,8	38,3	
111	19,4	22,4	19,0	18,9	
112	100	100	100	100	
113	8,6	8,5	8,7	9,0	
114	0,3	0,3	0,3	0,4	



## CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

L'analyse des solutions de calibration, avec suivi du fragment majoritaire correspondant au monomère (cf. Figure 3.8), montre pour les trois types de nanoplastiques, des calibrations moyenne linéaires sur toute la gamme de calibration, avec un  $R^2$  supérieur à 0,997 et avec une pente significative (erreur relative de la pente inférieure à 2%). En revanche, les résidus, présentés dans l'Annexe 4, sont assez élevés, en particulier pour les faibles quantités de nanoplastiques, ce qui peut être expliqué par les variations assez fortes des analyses de Py-GC/MS, variations plus marquées pour les quantités proches des limites de quantification (cf. partie III. 3. Répétabilité, et limites de détection).

Le Tableau 3.2 montre que la répartition des différents fragments est bien répétable, indépendamment de la quantité analysée, pour les trois types de nanoplastiques, à l'exception du point pour l'analyse de 0,45  $\mu\text{g}$  de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%, qui donne une proportion de fragment M-1 et M-2 légèrement plus élevée. Si on ne considère pas cette anomalie, on peut déduire les fragments choisis ( $m/z=110$ , 109 et 112, pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP<sub>TA</sub>-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100%, respectivement) sont représentatifs sur toute la gamme de calibration et qu'ils peuvent être utilisés pour quantifier ces trois nanoplastiques.

### III. 3. Répétabilité, et limites de détection et de quantification

#### III. 3. 1. 1. Répétabilité et fidélité intermédiaire

La répétabilité a été évaluée pour le mode SIM (mode utilisé ensuite pour la quantification) en analysant 0,024  $\mu\text{g}$  de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et en suivant la masse  $m/z=109$ . Les analyses effectuées en 6 réplicats, ont permis l'obtention d'une aire moyenne du pic de  $8,4 \cdot 10^3 \pm 0,4$ , soit 4,9% d'erreur relative.

La répétabilité des analyses a également été évaluée à l'aide de plusieurs analyses successives ( $n=5$ ) de 0,024 et 1,5  $\mu\text{g}$  de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%, en mode SCAN. Des écarts-types relatifs de 5,1% et 4,2% ont été obtenus, respectivement (pour la masse  $m/z=109$ ), ce qui montre une bonne répétabilité, similaire à la répétabilité observée en mode SIM, mais légèrement moins bonne pour les points les plus bas de la calibration.

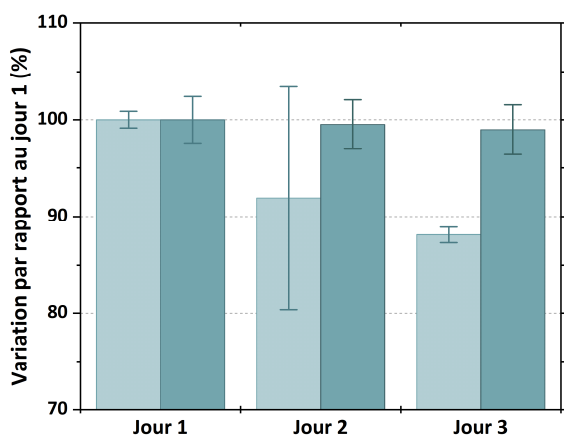


Figure 3.9: Variation relative de l'intensité du fragment  $m/z=109$  produit par la pyrolyse de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% ( $n=3$  réplicats), en fonction du temps et de la masse de nanoplastiques analysée : 0,024  $\mu\text{g}$  (bleu clair) et 1,5  $\mu\text{g}$  (bleu foncé).

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotope

Afin d'évaluer la variabilité dans le temps, les mêmes analyses ont été répétées sur 3 jours (3 réplicats par jour) et leurs résultats sont présentés dans la Figure 3.9. On observe une diminution moyenne du signal observé en fonction du temps, plus forte pour la quantité minimale de nanoplastiques analysés. De plus, si l'on calcule l'écart-type des résultats sur les trois jours, on obtient 12% pour les analyses de 0,024 µg et 2% pour les analyses de 1,5 µg de nanoplastiques analysés. Les incertitudes des résultats sont donc plus fortes pour les analyses étalées dans le temps plutôt que ponctuelles, en particulier pour les faibles masses, comme observé dans les étalonnages.

#### III. 3. 1. 2. Limites de détection instrumentales

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les limites de détection. Etant donné que les blancs instrumentaux étaient très propres, il a été décidé de calculer la limite de détection instrumentale (LDI) en prenant en compte l'incertitude des analyses de Py-GC/MS.<sup>196-198</sup> Le calcul a donc été fait à l'aide de l'équation 3.6, à partir de l'analyse de 24 ng de NP réalisée en mode SIM (6 réplicats), en suivant les masses fragments de masse  $m/z = 109$  et  $110$ , respectivement. Les analyses ayant donné les aires de  $8406 \pm 413$  pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%, et  $6433 \pm 333$  pour les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, on obtient les valeurs suivantes :  $LDI_{NP-(2H)5-100\%} = 4,0$  ng et  $LDI_{NP-(13C)6-100\%} = 4,2$  ng.

$$LDI = t_{\alpha, v} * \frac{s_y}{\bar{y}} * x \quad 3.6$$

Avec :

- $t_{\alpha, v}$  : coefficient de student, égal à 3,365 pour  $\alpha=0,01$  et  $v=5$  ( $n-1$ )
- $s_y$  : incertitude des aires données en Py-GC/MS
- $\bar{y}$  : valeur moyenne des aires
- $x$  : masse de nanoplastiques analysés

#### III. 3. 1. 3. Limites de détection et de quantification de méthode

Les limites de détection de la méthode (ici appelé LD), contrairement à celle instrumentale, tiennent compte du signal apporté par la matrice. Les LD en termes de signaux détectés, ici l'aire du fragment suivi, peuvent être calculées, à partir de l'équation 3.7, et converties en limite de masses détectables grâce aux calibrations. De la même façon, les limites de quantification (LQ) peuvent être déterminées à l'aide de l'équation 3.8 et des calibrations.

$$y_{LD} = \bar{y}_{\text{blanc matrice}} + 3 * s_{\text{blanc matrice}} \quad 3.7$$

Avec :

- $y_{LD}$  : limite de détection en y
- $\bar{y}$  : valeur moyenne des aires obtenues pour les blancs matrices
- $s_y$  : incertitude des aires obtenues pour les blancs matrices

$$y_{LQ} = \bar{y}_{\text{blanc matrice}} + 10 * s_{\text{blanc matrice}} \quad 3.8$$

Avec :

- $y_{LQ}$  : limite de quantification en y
- $\bar{y}$  : valeur moyenne des aires obtenues pour les blancs matrices
- $s_y$  : incertitude des aires obtenues pour les blancs matrices

Les LD de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, ont donc été calculées, en tenant compte des matrices utilisées pour les applications finales (cf. Chapitre 4), c'est-à-dire à partir d'analyses de daphnies et

## CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

d'artémias non contaminées, respectivement. Pour les nanoplastiques deutérés, l'analyse de daphnies (pour 15 organismes), réalisée en mode SIM, en suivant la masse  $m/z=109$ , a permis de déterminer une  $LD_{NP-(2H)5-100\%} = 7,4$  ng et  $LQ_{NP-(2H)5-100\%} = 18,3$  ng. Pour les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}C$ , l'analyse des artémias (pour 1 organisme), réalisée en mode SIM, en suivant la masse  $m/z=110$ , a permis de déterminer une  $LD_{NP-(13C)6-100\%} = 34$  ng et  $LQ_{NP-(13C)6-100\%} = 47$  ng.

### III. 4. Effets de matrice

#### III. 4. 1. Effets des sels

Nous avons vu dans la partie III. 1. qu'il était possible de quantifier les nanoplastiques marqués, avec des calibrations linéaires sur une gamme donnée. Cependant, les solutions d'étalonnage ayant été préparées avec de l'eau MilliQ, puis séchées avant analyse, ces calibrations ont été faites sur les nanoplastiques uniquement, sans aucune matrice. Or, dans le chapitre 4, les nanoplastiques vont être mélangés à d'autres composés, tels que de la matière organique, ou des sels, puisqu'ils seront mis en contact avec des crustacés planctoniques, les daphnies ou les artémias. Pour les daphnies, les nanoplastiques seront dispersés dans de l'eau douce de référence (ISO 6341), c'est-à-dire de l'eau douce présentant quelques ions, nécessaires aux organismes. Pour les artémias, les nanoplastiques seront mélangés à de l'eau de mer. Il a donc été important de repérer d'éventuels effets de matrice dus à la présence de sels.

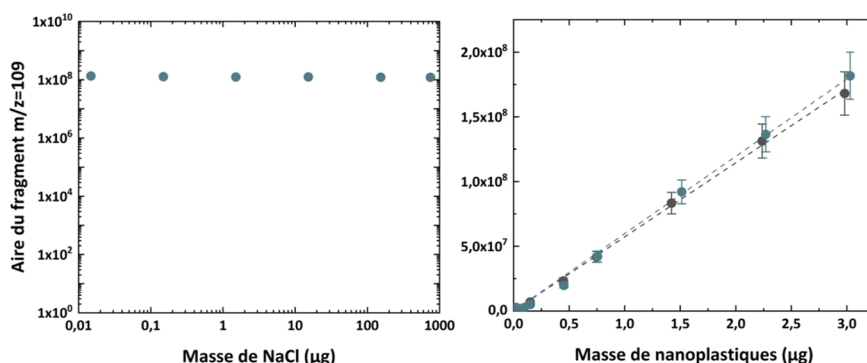


Figure 3.10: A gauche : Aire du fragment  $m/z=109$  produit après pyrolyse de  $1,5 \mu\text{g}$  de  $NP-(^2H)_5-100\%$ , en fonction de la masse de NaCl ajoutée avec l'échantillon. A droite : Calibrations de  $NP-(^2H)_5-100\%$  préparés dans de l'eau MilliQ (gris), ou dans l'eau douce de référence (bleu), et analysés en suivant le fragment de masse  $m/z=109$ . Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN.

Pour vérifier ces effets de matrice,  $1,5 \mu\text{g}$  de  $NP-(^2H)_5-100\%$  ont été analysés avec différentes masses de NaCl. Les résultats présentés dans la Figure 3.10, de gauche, montrent que la présence des sels ne fait pas varier l'aire du fragment  $m/z=109$ , y compris à forte concentration, soit jusqu'à 1 mg de NaCl dans la cup de pyrolyse, correspondant à l'analyse de  $30 \mu\text{L}$  de solution concentrée à 25 g/L. Dans la Figure 3.10 de droite, sont présentées les droites d'étalonnage réalisées avec les  $NP-(^2H)_5-100\%$ , en suivant le fragment  $m/z=109$ , après une préparation dans de l'eau MilliQ (gris), c'est-à-dire sans apport d'ions, ou dans l'eau douce de référence (bleu), avec apports d'ions. Les calibrations se superposent ce qui indique qu'il n'y a pas d'effets de matrice significatifs. Ces résultats sont confirmés par le fait qu'on ne relève pas de différence de répartition des différents fragments de masses  $m/z$  compris entre 104 et 111, que l'on soit en présence de sels ou non (cf. Annexe 5).

### III. 4. 2. Matrices organiques

Comme indiqué précédemment, l'objectif final de cette étude était de pouvoir quantifier les nanoplastiques dans les matrices complexes que sont les organismes *Daphnia magna* et *Artemia sp.* Si aucun effet n'a été observé en présence de sels, les matrices organiques pourraient, quant à elles, engendrer des effets de matrice, du fait de leur complexité. Plusieurs tests ont donc été effectués pour s'assurer que la quantification des nanoplastiques soit possible dans de telles matrices.

Dans un premier temps, plusieurs matrices « modèles » ont été étudiées : l'acide humique, l'alginate et la BSA (de l'anglais *Bovin Serum Albumin*), substances visant à représenter des matrices organiques de trois origines différentes : terrestre, marine ou bactériologique, et animale respectivement. Ces matrices ont été analysées sans ajout de nanoplastiques pour vérifier qu'elles ne produisent pas les fragments que nous avons choisi de suivre en Py-GC/MS. Les pyrogrammes obtenus, pour les masses  $m/z=104$ , 109, 110 et 112, sont présentés dans la Figure 3.11. On peut y voir que l'acide humique ne produit presque pas de signal après pyrolyse aux masses recherchées. L'alginate et la BSA, en revanche, produisent du styrène de masse  $m/z=104$  (en vert), mais pas d'autres fragments aux masses 109, 110 et 112.

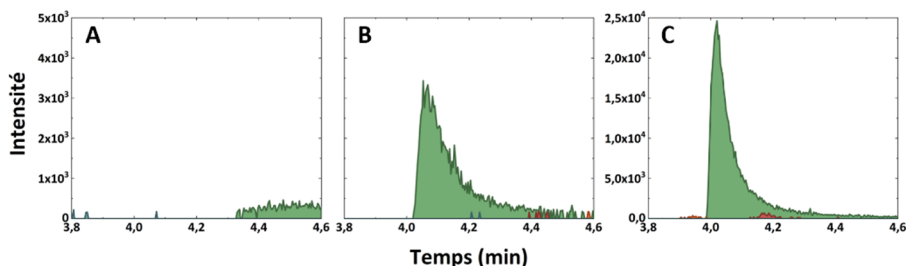


Figure 3.11: Pyrogrammes des matrices organiques modèles : acide humique (A), alginate (B), et albumine de sérum bovin ou BSA (C), avec suivi des masses  $m/z=104$  (vert), 109 (bleu), 110 (rouge) et 112 (orange). Les analyses ont été réalisées pour 30  $\mu\text{g}$  de matrices organiques modèles, à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN.

De la même manière, plusieurs matrices plus complexes ont aussi été analysées : *Daphnia magna*, *Artemia sp.* et *Mytilus edulis*. Après avoir été séchées ou lyophilisées et broyées, les matrices ont été analysées seules, pour vérifier les fragments produits par la matrice en elle-même, en absence de nanoplastiques. Les résultats ont été présentés dans la Figure 3.12 (Graphiques A-C-E). Les deux premières matrices ont été étudiées en vue des expérimentations présentées dans le Chapitre 4. La troisième matrice a été choisie, pour tester une matrice différente, probablement plus riche en lipides.

Les pyrogrammes obtenus montrent, comme attendu, que ces matrices organiques complexes produisent, lors de la pyrolyse, des molécules de styrène de masse  $m/z=104$ . Cependant, pour les masses correspondantes aux trois types de nanoplastiques marqués, aucun fragment n'est détecté de manière significative, après pyrolyse des matrices seules. Les fragments choisis sont donc bien spécifiques aux nanoplastiques et peuvent être utilisés pour leur quantification.

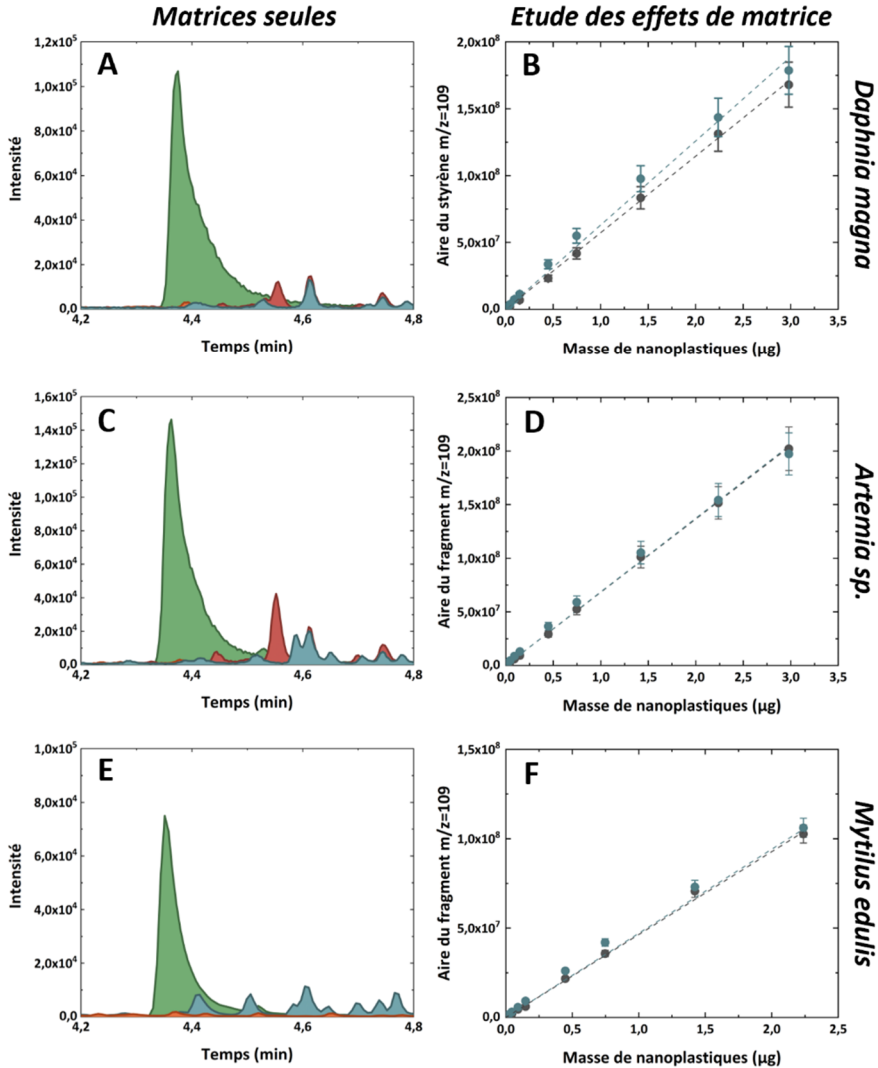


Figure 3.12: A gauche : Pyrogrammes des matrices sans nanoplastiques : *Daphnia magna* (A), *Artemia sp.* (C), et *Mytilus edulis* (E), avec suivi des masses  $m/z=104$  (vert), 109 (bleu), 110 (rouge) et 112 (orange). A droite : Calibrations de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% avec matrice (bleu) et sans matrice (gris), pour les matrices : *Daphnia magna* (B), *Artemia sp.* (D), et *Mytilus edulis* (F), en suivant la masse  $m/z=109$ . Les analyses avec matrice ont été faites avec les quantités suivantes : 20 organismes séchés pour *Daphnia magna* (A-B), et 150  $\mu\text{g}$  de matrice lyophilisée et broyée pour *Artemia sp.* (C-D), et *Mytilus edulis* (E-F). Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN (A-B-C-D) ou SIM (E-F).

Dans la Figure 3.12, sont aussi présentées (à droite), les droites d'étalonnage réalisées avec les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% (en suivant la masse  $m/z=109$ ), en présence et en absence des matrices complexes, afin de repérer d'éventuels effets de matrice. On peut voir dans les graphiques B-D-F, que pour les trois matrices, les calibrations, se superposent, qu'elles aient été faites en présence des matrices ou en leur absence, ce qui indique qu'il n'y a pas d'effets de matrice significatifs. Pour la matrice *Daphnia magna*, le détail des intensités relatives de tous les fragments de masses  $m/z$  comprises entre 101 et 112, a été rapporté dans l'Annexe 6. Outre l'augmentation des fragments de masse  $m/z=104$ , et des fragments les plus proches, on n'observe pas de différences de répartition des fragments, entre les analyses faites avec et sans matrice, contrairement aux observations de Lauschke *et al.* pour des matrices inorganiques.<sup>183</sup>

L'analyse des matrices organiques a montré l'intérêt du marquage des nanoplastiques pour leur quantification dans des matrices organiques, en Py-GC/MS, grâce à la spécificité des fragments produits et à l'absence d'effets de matrice.

#### III. 5. Bilan

Lors du développement de cette méthode, l'objectif était de montrer la possibilité de quantifier, en Py-GC/MS, des nanoplastiques dans des matrices organiques complexes, afin de suivre leur accumulation dans les crustacés planctoniques *Daphnia magna* et *Artemia sp.*

Cette étude a permis de prouver que le marquage à l'isotopie permet de quantifier des nanoplastiques de polystyrène grâce à des fragments spécifiques et quantifiables, non produits par les matrices environnementales, contrairement au polystyrène non marqué. Après avoir identifié ces fragments spécifiques et optimisé les paramètres de pyrolyse, des calibrations linéaires et répétables ont pu être mises en place. Le calcul des limites de quantification a prouvé que ces calibrations permettaient la quantification des faibles quantités de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, y compris dans les matrices complexes étudiées dans le Chapitre 4 (à partir de 18 dans les daphnies et 47 ng dans les artémias, respectivement). Enfin, aucun effet de matrice n'a été observé que ce soit par la présence de matrices organiques ou d'éventuels sels ajoutés dans le milieu.

La méthode ainsi développée a pu être utilisée en conditions réelles dans le Chapitre 4 pour quantifier, à l'aide du Py-GC/MS, les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% dans les daphnies et les artémias, respectivement, ou dans leur milieu d'exposition associés.

## IV. Quantification des nanoplastiques par EA-IRMS

### IV. 1. Objectif

L'EA-IRMS, généralement utilisée pour caractériser des échantillons, peut également permettre de quantifier une substance dans un mélange, à la condition que le composé visé et la matrice aient été caractérisés individuellement. L'objectif du développement de méthode présenté ici est de montrer que la quantification de nanoplastiques dans une matrice organique est possible. Notre but est de permettre une quantification des nanoplastiques, à des niveaux les plus bas possibles, dans des matrices complexes, en particulier dans les organismes *Artémia sp.*, en vue de l'étude écotoxicologique présentée dans le Chapitre 4. Cette utilisation de l'EA-IRMS n'étant pas usuelle et n'ayant pas été décrite dans la littérature, la démonstration a été faite de manière théorique (avec une explication détaillée des calculs effectués) mais aussi expérimentale, en caractérisant les nanoplastiques, les matrices seules, et des mélanges des deux substances.

### IV. 2. Calcul de la signature isotopique d'un mélange entre deux substances A et B

#### IV. 2. 1. A partir de la fraction molaire entre A et B

Dans cette partie, le but est d'obtenir la fraction isotopique d'un isotope d'un mélange entre deux substances A et B, ici pour le carbone  $^{13}\text{C}$  :  $x(^{13}\text{C})_{AB}$ , en connaissant les fractions isotopiques des deux substances seules, ici  $x(^{13}\text{C})_A$  et  $x(^{13}\text{C})_B$ , et la fraction molaire de chaque substance,  $x_A$  et  $x_B$ .

Si on part de la définition décrite dans la partie I. 2. 3. Les notations de l'isotopie (cf. équation 3.2), la fraction isotopique en carbone  $^{13}\text{C}$  d'un mélange entre deux substances A et B, peut s'écrire de la manière suivante :

$$x(^{13}\text{C})_{AB} = \frac{n(^{13}\text{C})_{AB}}{n(\text{C})_{AB}} = \frac{n(^{13}\text{C})_A + n(^{13}\text{C})_B}{n(\text{C})_A + n(\text{C})_B} \quad 3.9$$

En utilisant les fractions molaires de chaque substance, cette fraction isotopique du mélange peut être calculée à partir de l'équation 3.10 :

$$x(^{13}\text{C})_{AB} = \frac{x_A \times N(\text{C})_A \times x(^{13}\text{C})_A + x_B \times N(\text{C})_B \times x(^{13}\text{C})_B}{x_A \times N(\text{C})_A + x_B \times N(\text{C})_B} \quad 3.10$$

Avec  $N(\text{C})_A$  et  $N(\text{C})_B$  le nombre de carbone par unité de substance A ou B, 8 par exemple dans le cas de l'unité styrène des nanoplastiques.

#### IV. 2. 2. A partir de fraction massique entre A et B

Dans le cas de substances plus complexes, pour lesquelles on n'aurait pas accès à leurs fractions molaires respectives, il est tout de même possible d'obtenir la fraction isotopique du mélange :  $x(^{13}\text{C})_{AB}$ , en connaissant la fraction isotopique des deux substances seules,  $x(^{13}\text{C})_A$  et  $x(^{13}\text{C})_B$ , la fraction massique de chaque substance,  $w_A$  et  $w_B$ , ainsi que les pourcentages de carbone des deux substances  $\%C_A$  et  $\%C_B$ .

Nous savons d'après l'équation 3.9 que la fraction isotopique en carbone  $^{13}\text{C}$  d'un mélange entre deux substances A et B peut s'écrire de la manière suivante :

$$x(^{13}\text{C})_{AB} = \frac{n(^{13}\text{C})_A + n(^{13}\text{C})_B}{n(\text{C})_{AB}}$$

$$\text{Or, } n(^{13}\text{C})_A = n(\text{C})_A \times x(^{13}\text{C})_A, \text{ donc } x(^{13}\text{C})_{AB} = \frac{n(\text{C})_A \times x(^{13}\text{C})_A + n(\text{C})_B \times x(^{13}\text{C})_B}{n(\text{C})_{AB}}$$

On obtient donc, avec  $x(\text{C})_A$  et  $x(\text{C})_B$  la fraction en carbone de A et B, respectivement :

$$x(^{13}\text{C})_{AB} = x(\text{C})_A \times x(^{13}\text{C})_A + x(\text{C})_B \times x(^{13}\text{C})_B \quad 3.11$$

$$\text{Avec } x(\text{C})_A = \frac{n(\text{C})_A}{n(\text{C})_{AB}} \text{ et } x(\text{C})_B = \frac{n(\text{C})_B}{n(\text{C})_{AB}}.$$

Les fractions en carbone de A et de B,  $x(\text{C})_A$  et  $x(\text{C})_B$ , peuvent être obtenues à partir des fractions massiques,  $w_A$  et  $w_B$ , et des pourcentages de carbone des deux substances  $\%C_A$  et  $\%C_B$ , d'après l'équation 3.12, écrite à titre d'exemple pour la substance A, et dont l'obtention a été expliquée en détail dans l'Annexe 7.

$$\frac{1}{x(\text{C})_A} = \left(k \times \frac{1}{w_A}\right) + 1 - k \quad 3.12$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_B(12+x(^{13}\text{C})_A)}{\%C_A(12+x(^{13}\text{C})_B)}.$$

En combinant les équations 3.11 et 3.12 (voir explication dans l'Annexe 8), on obtient l'équation 3.13 qui montre une relation linéaire entre la fraction isotopique du mélange  $x(^{13}\text{C})_{AB}$  (sous la forme de  $\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{AB} - x(^{13}\text{C})_B}$ ) et la fraction massique de chaque substance (sous la forme de  $\frac{1}{w_A}$ ).

$$\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{AB} - x(^{13}\text{C})_B} = \left(\frac{1}{x(^{13}\text{C})_A - x(^{13}\text{C})_B} k\right) \times \frac{1}{w_A} + \frac{1}{x(^{13}\text{C})_A - x(^{13}\text{C})_B} \times (1 - k) \quad 3.13$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_B(12+x(^{13}\text{C})_A)}{\%C_A(12+x(^{13}\text{C})_B)}.$$

L'équation peut être réécrite pour en extraire  $x(^{13}\text{C})_{AB}$  (cf. équation 3.14) ou  $w_A$  (cf. équation 3.15) :

$$x(^{13}\text{C})_{AB} = \left(\frac{1}{x(^{13}\text{C})_A - x(^{13}\text{C})_B} \times k \times \frac{1}{w_A} + \frac{1}{x(^{13}\text{C})_A - x(^{13}\text{C})_B} \times (1 - k)\right)^{-1} + x(^{13}\text{C})_A \quad 3.14$$

$$w_A = \left(\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{AB} - x(^{13}\text{C})_A} \times \frac{x(^{13}\text{C})_A - x(^{13}\text{C})_B}{k} + 1 - \frac{1}{k}\right)^{-1} \quad 3.15$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_B(12+x(^{13}\text{C})_A)}{\%C_A(12+x(^{13}\text{C})_B)}.$$

Au travers de ces calculs théoriques, on voit qu'il existe une relation entre la composition en  $^{13}\text{C}$  d'un mélange AB, la composition isotopique de chaque composant et les fractions massiques de ces composants. Par la suite, cette formule sera appliquée pour simuler la signature isotopique des nanoplastiques, qui en tant que copolymères, peuvent être considérés comme un mélange entre différents types d'unités monomères. La formule pourra également être appliquée pour caractériser des mélanges entre nanoplastiques et matrices organiques.



### IV. 3. Simulations pour des nanoplastiques seuls et mélangés à la matrice organique

#### IV. 3. 1. Simulation de la signature isotopique des nanoplastiques seuls

Les nanoplastiques développés au laboratoire sont des copolymères composés principalement de trois éléments, une fraction de monomère non marqué (du styrène, S), une fraction de comonomère marqué (du styrène enrichi, Se) et une fraction de comonomère hydrophile (de l'acide acrylique Ac). La présence d'amorceur, ajouté en très faible quantité, a été négligée. Les fractions molaires de ces comonomères ont été définies comme représenté dans la Figure 3.13.

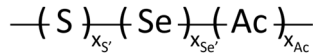


Figure 3.13 : Composition des nanoplastiques marqués : Styrène (S), Styrène enrichi (Se) et Acide acrylique (Ac), avec  $x_S$ ,  $x_{Se}$  et  $x_{Ac}$  leurs fractions molaires respectives et  $x_S + x_{Se} + x_{Ac} = 1$ .

D'après l'équation 3.10, on peut calculer la fraction isotopique de carbone  $^{13}\text{C}$  des nanoplastiques en fonction de leur composition :

$$x(^{13}\text{C})_{NP} = \frac{x_S \times N(\text{C})_S \times x(^{13}\text{C})_S + x_{Se} \times N(\text{C})_{Se} \times x(^{13}\text{C})_{Se} + x_{Ac} \times N(\text{C})_{Ac} \times x(^{13}\text{C})_{Ac}}{x_S \times N(\text{C})_S + x_{Se} \times N(\text{C})_{Se} + x_{Ac} \times N(\text{C})_{Ac}} \quad 3.16$$

Avec :

- $x_S + x_{Se} + x_{Ac} = 1$
- $x_S + x_{Se} = 1$
- $x_S = (1 - x_{Ac}) \times x_S$  et  $x_{Se} = (1 - x_{Ac}) \times x_{Se}$

Les signatures isotopiques de chaque élément  $i$  :  $x(^{13}\text{C})_S$ ,  $x(^{13}\text{C})_{Se}$  et  $x(^{13}\text{C})_{Ac}$  de l'équation 3.16 peuvent être issues des données expérimentales ou calculées à partir de la composition élémentaire du composé, grâce à l'équation 3.17 :

$$x(^{13}\text{C})_i = \frac{N(^{13}\text{C}) + N(^{12}\text{C}) \times x(^{13}\text{C})_{nat}}{N(\text{C})} \quad 3.17$$

Avec :

- $x(^{13}\text{C})_i$  : signature isotopique en carbone  $^{13}\text{C}$  du composé  $i$
- $N(^{13}\text{C})$  : nombre d'atomes de carbone  $^{13}\text{C}$  par molécule
- $N(\text{C})$  : nombre d'atomes de carbone par molécule
- $x(^{13}\text{C})_{nat} = 0,0107$ , l'abondance naturelle moyenne du carbone  $^{13}\text{C}$

A l'aide de ces équations, on peut donc estimer la fraction isotopique en carbone  $^{13}\text{C}$  de nanoplastiques marqués en carbone  $^{13}\text{C}$ , de différentes manières. Le calcul a donc été fait pour différents nanoplastiques et leurs compositions respectives (cf. Tableau 3.3) à partir de l'équation 3.16. Pour ce calcul, les fractions isotopiques des monomères enrichis  $x(^{13}\text{C})_{Se}$  ont été obtenues à l'aide de l'équation 3.17, selon la composition des monomères utilisés, et avec  $x(^{13}\text{C})_{nat} = 0,0107$ . Pour les  $x(^{13}\text{C})$  du styrène non marqué et de l'acide acrylique, les valeurs ont été fixées sur les données expérimentales obtenues par Berto *et al.* soit environ  $\delta^{13}\text{C} = -29\%$  et  $-27,5\%$

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotope

respectivement (et donc  $x(^{13}\text{C})_S = 1,079\%$  et  $x(^{13}\text{C})_{Ac} = 1,081\%$ ).<sup>193</sup> Les autres paramètres utilisés pour calculer la signature isotopique de carbone ont été les suivants :

- $x_{Ac} = 0,096$  (obtenue par analyse RMN de NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, et attribuée aux autres NP pour une meilleure comparaison des autres paramètres)
- $x_{Se}$  selon la composition indiquée dans le Tableau 3.3
- $x_S = 1 - x_{Se}$
- $N(C)_S$  et  $N(C)_{Se} = 8$
- $N(C)_{Ac} = 3$

Les équations 3.16 et 3.17 peuvent aussi être adaptées pour déterminer la fraction isotopique de deutérium des nanoplastiques marqués en deutérium. Il faut cependant noter que, contrairement au carbone qui a pour référence le V-PDB, la notation  $\delta^2\text{H}$  est calculée à partir de la référence *Standard Mean Ocean Water* (SMOW) de valeur  $R\left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)_{Std} = 0,00015576$ .<sup>199</sup> Pour le calcul, les fractions isotopiques des monomères enrichis  $x(^2\text{H})_{Se}$  ont été obtenus en utilisant la version adaptée de l'équation 3.17, selon la composition des monomères utilisés, et avec  $x(^2\text{H})_{nat} = 0,000115$ . Pour les  $x(^2\text{H})$  du styrène non marqué et de l'acide acrylique, les valeurs ont été fixées d'après la valeur donnée pour le matériau de référence USGS77, qui est une poudre de polyéthylène de valeur  $\delta^2\text{H} = -75,9\text{‰}$  (et donc  $x(^2\text{H}) = 0,00144\%$ ). Les autres paramètres utilisés pour calculer la fraction isotopique en deutérium sont les suivants :

- $x(^2\text{H})_S$ ,  $x(^2\text{H})_{Se}$  et  $x(^2\text{H})_{Ac}$  calculées selon la version adaptée de l'équation 3.17, avec  $x(^2\text{H})_{nat} = 0,000115$
- $x_{Ac} = 0,096$ , obtenue par analyse RMN de NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, et attribuée aux autres NP pour une meilleure comparaison des autres paramètres
- $x_{Se}$  selon la composition indiquée dans le Tableau 3.3
- $x_S = 1 - x_{Se}$
- $N(H)_S$  et  $N(H)_{Se} = 8$
- $N(H)_{Ac} = 4$

Les quelques compositions étudiées de manière théorique dans le Tableau 3.3 nous permettent de réaliser les différents niveaux de marquage en fonction de la composition. Tout d'abord, on voit que, dès le remplacement d'un seul carbone <sup>13</sup>C, pour seulement 11% du styrène, on obtient une fraction isotopique en <sup>13</sup>C, deux fois plus élevée que celle d'un nanoplastique non marqué. En augmentant la proportion de styrène marqué de 11 à 100%, la fraction est augmentée d'un facteur 5. De même en augmentant le nombre de carbones <sup>13</sup>C de 1 à 6, la fraction est également augmentée d'un facteur 5.

Si l'on compare, dans les mêmes conditions, les fractions isotopiques x des nanoplastiques marqués au deutérium, avec ceux marqués au carbone <sup>13</sup>C, les nanoplastiques marqués au deutérium donnent, en théorie, une fraction isotopique x moins forte (1,3 contre  $1,2 \cdot 10^3$ , pour un seul isotope plus lourd par monomère pour 11% de styrène marqué). Ceci est expliqué par l'abondance naturelle du deutérium qui est beaucoup plus basse que celle du <sup>13</sup>C, ce qui se répercute sur la signature isotopique des parties non marquées du copolymère. Cependant, les nanoplastiques marqués au deutérium restent très intéressants car l'abondance du deutérium dans la matière organique est aussi très basse, donc l'ajout de très peu de nanoplastiques devrait faire varier drastiquement le  $\delta^2\text{H}$  du mélange.

## CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

**Tableau 3.3:** Signatures isotopiques théoriques de nanoplastiques.

Types de nanoplastiques	$x_{Se}$	$x(^{13}C)_{NP}$ (%)	$\delta^{13}C_{NP}$ (‰)	$x(^2H)_{NP}$ (%)	$\delta^2H_{NP}$ (‰)
NP <sub>nat</sub>	0	1,08	-29	0,0014	-76
NP-( <sup>13</sup> C) <sub>1</sub> -11%	0,11	2,4	$1,2 \cdot 10^3$	-	-
NP-( <sup>13</sup> C) <sub>1</sub> -100%	1	13,0	$1,2 \cdot 10^4$	-	-
NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%	1	72,7	$2,4 \cdot 10^5$	-	-
NP-( <sup>2</sup> H) <sub>1</sub> -11%	0,11	-	-	1,3	$8,4 \cdot 10^4$
NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%	1	-	-	59,0	$9,3 \cdot 10^6$
NP-( <sup>2</sup> H) <sub>8</sub> -100%	1	-	-	94,5	$1,1 \cdot 10^8$

### IV. 3. 2. Simulation des signatures isotopiques des nanoplastiques mélangés à la matière organique

Nous avons montré dans les paragraphes précédents qu'il était possible de calculer de façon théorique la fraction isotopique de différents nanoplastiques marqués. De manière similaire, il est possible de simuler l'évolution de la signature isotopique lorsque l'on ajoute des quantités croissantes des nanoplastiques dans une matrice organique connue. La fraction isotopique en carbone <sup>13</sup>C totale,  $x(^{13}C)_{tot}$ , du mélange peut être calculée en fonction de la fraction massique de nanoplastiques ( $w_{NP}$ ), à partir de l'équation 3.14, avec A=NP et B=MO, la fraction isotopique  $x(^{13}C)_{tot}$  peut ensuite être convertie en  $\delta^{13}C$  à l'aide de l'équation 3.4.

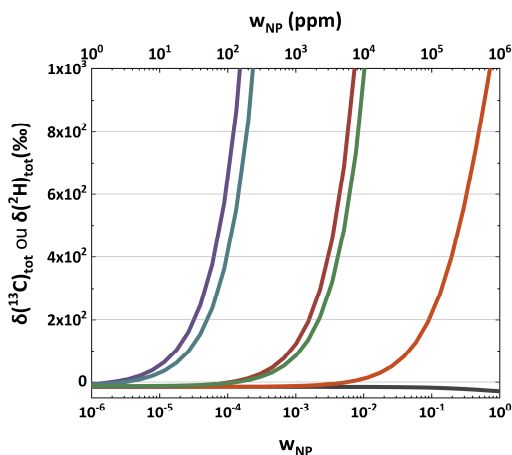
$$x(^{13}C)_{AB} = \left( \frac{1}{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B} \times k \times \frac{1}{w_A} + \frac{1}{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B} \times (1 - k) \right)^{-1} + x(^{13}C)_A \quad 3.14$$

$$\text{Soit } x(^{13}C)_{tot} = \left( \frac{1}{x(^{13}C)_{NP} - x(^{13}C)_{MO}} \times k \times \frac{1}{w_{NP}} + \frac{1}{x(^{13}C)_{MO} - x(^{13}C)_{MO}} \times (1 - k) \right)^{-1} + x(^{13}C)_{NP}$$

Avec :

- $k = \frac{\%C_{MO}(12 + x(^{13}C)_{NP})}{\%C_{NP}(12 + x(^{13}C)_{MO})}$
- $x(^{13}C)_{NP}$  obtenue avec l'équation 3.16

Ces simulations ont été faites pour différentes compositions de nanoplastiques et sont présentées dans la Figure 3.14. Les calculs ont été faits avec les fractions isotopiques des nanoplastiques présentés dans le Tableau 3.3. Pour le marquage au carbone <sup>13</sup>C, les paramètres suivants ont été choisis : un %C<sub>NP</sub> calculé à 90% d'après la composition des nanoplastiques,  $x(^{13}C)_{MO}$  a été fixée à 1,107% (pour un  $\delta(^{13}C)_{MO} = -15$  ‰) et %C<sub>MO</sub> à 40%, d'après les analyses présentées dans la partie IV. 5. Pour le marquage au deutérium, les paramètres suivants ont été choisis : un %H<sub>NP</sub> calculé à 7,6% d'après la composition des nanoplastiques,  $x(^2H)_{MO}$  a été fixée à 0,0154 % (pour  $\delta(^2H)_{MO} = -13$  ‰), selon la valeur maximale obtenue par Schiegl et Vogel pour des organismes marins,<sup>200</sup> et %H<sub>MO</sub> à 6,5 % d'après les analyses présentées dans la partie IV. 5.



**Figure 3.14:** Simulation du  $\delta^{13}\text{C}$  d'un mélange de nanoplastiques NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100% (violet, pour  $\delta(^2\text{H})_{\text{NP}} = 1,1 \cdot 10^8 \text{‰}$ ), NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% (bleu, pour  $\delta(^2\text{H})_{\text{NP}} = 9,3 \cdot 10^6 \text{‰}$ ), NP-( $^2\text{H}$ )<sub>1</sub>-11% (vert, pour  $\delta(^2\text{H})_{\text{NP}} = 8,4 \cdot 10^4 \text{‰}$ ), NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% (rouge, pour  $\delta(^{13}\text{C})_{\text{NP}} = 2,4 \cdot 10^5 \text{‰}$ ), NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>1</sub>-11% (orange, pour  $\delta(^{13}\text{C})_{\text{NP}} = 1,2 \cdot 10^4 \text{‰}$ ), ou NP<sub>nat</sub> (gris, pour  $\delta(^{13}\text{C})_{\text{NP}} = -29 \text{‰}$ ), en fonction de la fraction massique  $w_{\text{NP}}$ . Avec  $\delta(^{13}\text{C})_{\text{MO}} = -15 \text{‰}$  et  $\delta(^2\text{H})_{\text{MO}} = -13 \text{‰}$ .

La Figure 3.14 montre que le marquage des nanoplastiques permet d'obtenir des signaux isotopiques très différents de la matière organique. En comparaison, les nanoplastiques non marqués ont une signature isotopique proche de celle de la matière organique. Lorsque les nanoplastiques marqués sont mélangés avec une matrice organique, ils vont faire varier le signal isotopique vers un enrichissement en isotopes lourds, permettant, si la différence est détectable en EA-IRMS, de quantifier les nanoplastiques. Plus le marquage est fort, plus la quantité de nanoplastiques minimale à ajouter pour faire varier de manière significative le signal du mélange, c'est à dire la limite de détection, sera faible.

Au travers de la simulation, cette limite de détection a pu être estimée pour chaque type de nanoplastiques. Ainsi, pour une précision de l'EA-IRMS fixée à 0,01‰, la limite de détection serait d'environ 1 mg.g<sup>-1</sup> pour les nanoplastiques non marqués, contre 10 ppm pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>1</sub>-11%, soit une limite de détection environ 100 fois plus basse. Avec les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, la LD serait encore abaissée d'un facteur 50, soit à 0,2 ppm. Le marquage au deutérium semble aussi intéressant puisque, avec les mêmes conditions de marquage que les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>1</sub>-11% (un isotope plus lourd par monomère pour 11% du styrène), les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>1</sub>-11% auraient une limite de détection similaire à celle des NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%. Les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-11% et les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-11% donnent quant à eux des limites de détection inférieures à 0,01 ppm. Le marquage au deutérium paraît donc aussi très prometteur et pourrait potentiellement donner accès à des limites de détection plus basses que le marquage au carbone  $^{13}\text{C}$ , bien que la sensibilité de l'IRMS puisse potentiellement être moins bonne pour l'analyse d'hydrogène que pour le carbone (d'un rapport 5 environ).<sup>186</sup>

Un aspect qu'il faut tout de même prendre en compte avec le marquage est que les forts enrichissements peuvent entrainer des phénomènes tels que des effets de mémoire et éventuellement une saturation de l'appareil à partir d'un certain point. Cette limite a été observée autour de  $\delta(^{13}\text{C}) = 16000$  ou  $x(^{13}\text{C}) = 16 \text{‰}$  dans notre cas, ce qui correspondrait une fraction en nanoplastiques de 10% pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% (et pas de saturation pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>1</sub>-11%). Il est

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

donc important de veiller à ne pas dépasser cette limite. Dans le cas des effets mémoires, leur présence peut être vérifiée par l'analyse de matériaux de référence à la signature isotopique proche de celle de l'échantillon analysé.

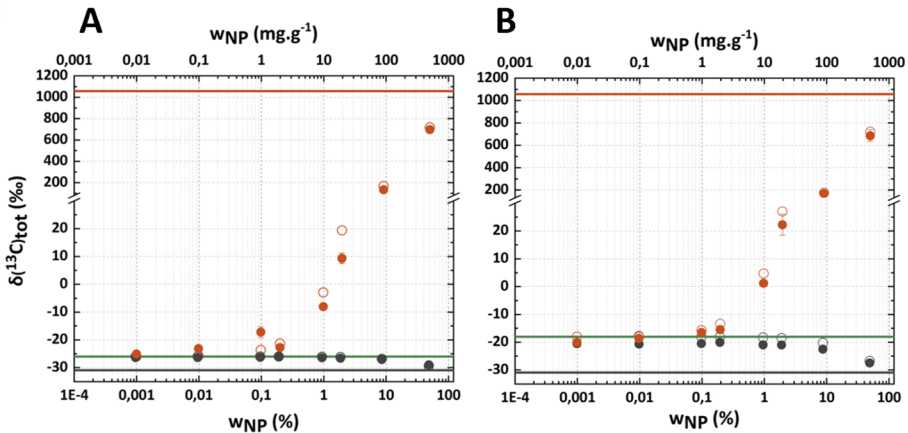
Ces simulations mettent en lumière le potentiel du marquage isotopique, de manière théorique. Pour des raisons de facilité d'accès à un EA-IRMS analysant le carbone, dans la suite du développement analytique, la méthode a été mise en pratique à l'aide de deux types de nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ .

#### IV. 4. Etude préliminaire avec NP- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%

Une première étude expérimentale a été faite en EA-IRMS afin confronter l'expérimental au modèle théorique, présenté précédemment. Pour cela, des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (NP- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%), et non marqués, ainsi que deux types de matière organique modèle ont été analysés en EA-IRMS, individuellement, puis en mélange. Les résultats des substances seules et des mélanges, sont présentés dans le Tableau 3.4 et la Figure 3.15, respectivement.

**Tableau 3.4:** Valeurs expérimentales de  $x(^{13}\text{C})$  et  $\delta(^{13}\text{C})$  obtenues pour les matières organiques modèles (acide humique et alginate) et les nanoplastiques (NP<sub>nat</sub> et NP- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%), et leur comparaison avec les valeurs théoriques calculées.

Echantillon	Valeurs expérimentales		Valeurs théoriques	
	$x(^{13}\text{C})$ (%)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{NP}}$ (‰)	$x(^{13}\text{C})_{\text{NP}}$ (%)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{NP}}$ (‰)
NP <sub>nat</sub>	1,07727 ± 0,0003	-30,90 ± 0,03	1,08	-29
NP- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%	2,26 ± 0,01	1058 ± 7	2,4	1180
Acide humique	1,0915 ± 0,0009	-25,97 ± 0,03	-	-
Alginate	1,08269 ± 0,00003	-18,0 ± 0,8	-	-



**Figure 3.15:**  $\delta^{13}\text{C}$  d'un mélange de nanoplastiques et de matière organique (en vert, A : acide humique et B : alginate) en fonction de la fraction massique en nanoplastiques non marqués (gris : NP<sub>nat</sub>) ou marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (orange : NP- $(^{13}\text{C})_{\beta}$ -11%). Les lignes et les ronds pleins correspondent aux  $\delta^{13}\text{C}$  expérimentaux des substances seules et des mélanges respectivement, et les ronds vides correspondent aux  $\delta^{13}\text{C}$  théoriques des mélanges.

Ces résultats montrent globalement une cohérence entre les  $\delta^{13}\text{C}$  expérimentaux et ceux calculés dans les simulations, que ce soit pour les nanoplastiques seuls ou pour les mélanges. Comme cela a été observé avec la simulation, les nanoplastiques non marqués (en gris) ont une signature

isotopique très proche des deux matières organiques, le signal isotopique du mélange n'est donc significativement différent de la matrice que lorsque de grandes quantités de NP sont ajoutées. En revanche, la présence des nanoplastiques marqués fait varier le signal du mélange de manière significative pour une quantité plus faible de nanoplastiques.

D'après l'équation 3.7, on considère que la présence des nanoplastiques est confirmée à partir d'une réponse en EA-IRMS ( $\delta^{13}C$ ) supérieure à 3x l'écart type obtenue pour l'analyse de la matrice. Les analyses de l'acide humique et l'alginate ayant donné les résultats de  $-25,97 \pm 0,03$  ‰ et  $-18,0 \pm 0,8$  ‰ respectivement, le seuil de détection peut être calculé à  $\delta^{13}C = -25,9$  et  $-15,5$  respectivement. A partir de ces valeurs, il est possible de calculer une limite de détection en nanoplastiques à l'aide de l'équation 3.15, avec  $A=NP$  et  $B=MO$ . Ainsi, la teneur minimale de  $NP-(^{13}C)_\beta-11\%$  détectable dans le mélange est de  $0,028$  mg/g de nanoplastiques pour l'acide humique, en raison d'une très bonne répétabilité des analyses de la matrice, et de  $0,791$  mg/g pour l'alginate. Cette étude nous a permis de mettre en pratique la théorie et de confirmer qu'il était possible de détecter des nanoplastiques, même faiblement enrichis.

$$w_A = \left( \frac{1}{x(^{13}C)_{AB} - x(^{13}C)_A} \times \frac{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B}{k} + 1 - \frac{1}{k} \right)^{-1} \quad 3.15$$

$$\text{Soit } w_{NP} = \left( \frac{1}{x(^{13}C)_{tot} - x(^{13}C)_{NP}} \times \frac{x(^{13}C)_{NP} - x(^{13}C)_{MO}}{k} + 1 - \frac{1}{k} \right)^{-1}$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_{MO}(12+x(^{13}C)_{NP})}{\%C_{NP}(12+x(^{13}C)_{MO})}$$

#### IV. 5. Développement de la méthode finale avec $NP-(^{13}C)_\beta-100\%$

Dans la partie IV. 3. 2. , les simulations ont montré que l'enrichissement des nanoplastiques est fort, plus les limites de détection seront basses. Il a été décidé afin de développer la méthode analytique finale (utilisée dans le Chapitre 4 partie IV.) avec  $NP-(^{13}C)_\beta-100\%$ , qui contiennent plus de 70% de carbone  $^{13}C$ . L'objectif de cette méthode analytique est de quantifier les nanoplastiques dans une matrice complexe, dans notre cas, des crustacés planctoniques (*Artémia sp.*), cf. Chapitre 4 partie IV. Le principe est donc d'accéder à la fraction massique en nanoplastiques, grâce à l'EA-IRMS, à partir des signatures isotopiques de l'échantillon de matrice contaminée à des niveaux inconnus, en connaissant la signature isotopique de la matrice non contaminée et celle des nanoplastiques seuls. Nous avons vu dans la partie IV. 2. 2. qu'il était également nécessaire de connaître les pourcentages de carbone des deux substances.

##### IV. 5. 1. Détermination de la signature isotopique des $NP-(^{13}C)_\beta-100\%$

Afin de quantifier des quantités inconnues de nanoplastiques dans des matrices organiques, il est donc nécessaire de connaître la signature isotopique des deux composants seuls. Cependant, pour les nanoplastiques enrichis, contrairement aux  $NP-(^{13}C)_\beta-11\%$ , il n'est pas possible d'analyser les  $NP-(^{13}C)_\beta-100\%$  purs en EA-IRMS puisqu'ils satureraient l'appareil à cause des taux extrêmes de carbones  $^{13}C$  qu'ils contiennent (cf. Tableau 3.3).

Pour déterminer la signature isotopique de  $NP-(^{13}C)_\beta-100\%$ , la méthodologie développée pour les mélanges a été appliquée sur des mélanges nanoplastiques marqués ( $NP_e$ ) et non marqués ( $NP_{nat}$ ). L'équation 3.13, qui peut être réécrite avec les notations  $A=NP_e$  et  $B=NP_{nat}$ , montre qu'il existe une relation linéaire entre la réponse analytique de l'IRMS au travers de l'expression de la fraction

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

isotopique sous la forme  $\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}}$  et l'inverse de la fraction massique en nanoplastiques marqués  $\frac{1}{w_{\text{NPe}}}$ .

$$\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{AB}} - x(^{13}\text{C})_{\text{B}}} = \left( \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{A}} - x(^{13}\text{C})_{\text{B}}} k \right) \times \frac{1}{w_{\text{A}}} + \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{A}} - x(^{13}\text{C})_{\text{B}}} \times (1 - k) \quad 3.18$$

Avec  $k = \frac{\%C_{\text{B}}(12+x(^{13}\text{C})_{\text{A}})}{\%C_{\text{A}}(12+x(^{13}\text{C})_{\text{B}})}$ .

$$\text{Soit : } \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} = \left( \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} \times k \right) \frac{1}{w_{\text{NPe}}} + \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} \times (1 - k)$$

$$\text{ou } \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} = A \times \frac{1}{w_{\text{NPe}}} + B$$

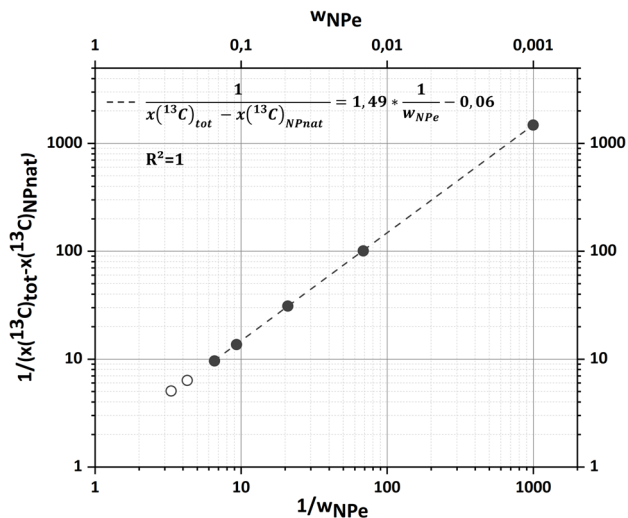
Avec :

- $A = \left( \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} \times k \right)$
- $B = \frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}} \times (1 - k)$
- $k = \frac{\%C_{\text{NPnat}}(12+x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}})}{\%C_{\text{NPe}}(12+x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}})} = kC \times \frac{(12+x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}})}{(12+x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}})}$
- $kC = \frac{\%C_{\text{NPnat}}}{\%C_{\text{NPe}}}$

Selon cette relation, en connaissant tous les autres paramètres, il est possible de déterminer la valeur de la fraction isotopique  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}$  et de calculer ainsi le  $\delta^{13}\text{C}_{\text{NPe}}$  des NP marqués. Les autres paramètres ont été déterminés expérimentalement ou par le calcul. La signature isotopique des nanoplastiques non marqués  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}$  a été déterminée par EA-IRMS. Le pourcentage de carbone ( $\%C_{\text{NPnat}}$ ) a été déterminé à l'aide d'un analyseur élémentaire. En raison d'effets isotopiques interférents sur la technique, l'analyse élémentaire n'a pas permis de déterminer le pourcentage en carbone des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% ( $\%C_{\text{NPe}}$ ) de manière fiable. Celui-ci a donc été calculé théoriquement à partir de la composition des nanoplastiques (avec  $x_{\text{Ac}}=0,096$ , obtenue par analyse RMN). Les paramètres obtenus sont les suivants :

- $x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}} = 1,0776 \pm 0,0001 \%$
- $\%C_{\text{NPnat}} = 87,3 \pm 0,2 \%$
- $\%C_{\text{NPe}} = 88,56 \pm 0,05 \%$
- $kC = \frac{\%C_{\text{NPnat}}}{\%C_{\text{NPe}}} = 0,985 \pm 0,004$

Plusieurs mélanges entre NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% et NP<sub>nat</sub>, de fractions  $w_{\text{NPe}}$  comprises entre 0,1% et 15,2%, ont donc été analysés et les résultats sont présentés dans la Figure 3.16. A noter que les fractions 23,4% et 30,2% ont aussi été analysées mais leurs signaux ayant saturé l'appareil, ils n'ont pas été pris en compte pour la détermination de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{NPe}}$ .



**Figure 3.16:** Signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6-100%</sub>) et non marqués (NP-nat), sous la forme de  $\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}}$ , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme  $\frac{1}{w_{\text{NPe}}}$  ou de  $w_{\text{NPe}}$ . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides sont les données ayant saturé l'EA-IRMS.

Les résultats obtenus suivent bien une relation linéaire, avec un  $R^2$  de 1. Un ajustement par régression non linéaire permet d'obtenir la valeur inconnue  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}}$ , en fixant les paramètres :  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}$ ,  $\%C_{\text{NPnat}}$  et  $\%C_{\text{NPe}}$ . Pour simplifier l'équation, le facteur  $kC = \frac{\%C_{\text{NPnat}}}{\%C_{\text{NPe}}}$  a plutôt été utilisé. L'incertitude de  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}}$  a été déterminée à l'aide des résultats obtenus avec les valeurs extrêmes des paramètres  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPnat}}$  et  $kC$ .

L'ajustement a donc permis d'obtenir la signature isotopique en carbone des NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6-100%</sub> qui est la suivante :  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}} = 71,1 \pm 0,2 \%$ , soit  $\delta^{13}\text{C}_{\text{NPe}} = 217700 \pm 200 \text{‰}$ . Dans la partie IV. 3. 1. (cf. Tableau 3.3), la valeur théorique de  $x(^{13}\text{C})_{\text{NPe}}$  avait été estimée à 72,7%. La valeur obtenue expérimentalement est très proche de celle donnée par la simulation, bien que légèrement plus basse, ce qui pourrait être expliqué par d'éventuelles contaminations qui ferait baisser la fraction de carbone  $^{13}\text{C}$  des échantillons.



IV. 5. 2. Mélange avec des matières organiques simples et complexes

Une fois que les nanoplastiques marqués ont été caractérisés, le but a été de tester la méthode avec plusieurs matières organiques : deux matières organiques modèles (acide humique et alginate) et la matrice complexe dans laquelle on souhaite quantifier les nanoplastiques (cf. Chapitre 4 partie IV.) : les crustacés planctoniques *Artemia sp.* Afin de pouvoir contrôler la quantité d'artémias analysée, celles-ci ont été lyophilisées puis broyées avant analyse.

Comme nous l'avons vu dans la partie IV. 2. 2. , il est nécessaire de caractériser la matrice organique seule pour pouvoir ensuite quantifier les nanoplastiques dans des mélanges. Les différentes matrices ont donc été analysées en EA-IRMS pour obtenir les  $x(^{13}C)_{MO}$  et les  $\%C_{MO}$  ont été obtenus à l'aide d'un analyseur élémentaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.5, en plus d'un rappel des valeurs obtenues pour NP-( $^{13}C$ )<sub>6</sub>-100%.

Tableau 3.5: Signatures isotopiques et pourcentages de carbone des NP-( $^{13}C$ )<sub>6</sub>-100% et des matières organiques.

Echantillon	$x(^{13}C)$ (%)	$\delta^{13}C$ (‰)	%C (%)
NP-( $^{13}C$ ) <sub>6</sub> -100%	71,1 ± 0,2	217700 ± 200	88,56 ± 0,05
Acide humique	1,08432 ± 0,00004	-24,48 ± 0,04	36,0 ± 0,1
Alginate	1,095 ± 0,001	-15,2 ± 0,6	30,27 ± 0,04
<i>Artemia sp.</i>	1,0911 ± 0,0001	-18,32 ± 0,11	38,36 ± 0,08

Les mélanges de nanoplastiques NP-( $^{13}C$ )<sub>6</sub>-100% et de matières organiques modèles ou artémias (pour les compositions entre 1 ng.g<sup>-1</sup> et 5% en masse de nanoplastiques pour ne pas saturer l'EA-IRMS) ont été analysés et les résultats sont présentés dans la Figure 3.17 et la Figure 3.18, respectivement. Pour les trois matrices, les valeurs isotopiques des mélanges varient de manière linéaire en fonction des fractions en NP ( $R^2 > 0,99998$ ) pour les fractions supérieures ou égales à 1.10<sup>-5</sup>, soit à 10 ppm. A partir de la fraction à 1 ppm, la variation due à l'apport en nanoplastiques est trop faible pour être correctement quantifiée par l'EA-IRMS, ce qui s'observe par des valeurs de éloignées des valeurs théoriques (en pointillés) et par des incertitudes très fortes.

Pour la portion linéaire, de la même façon que pour le mélange de nanoplastiques marqués et non marqués (cf. partie IV. 5. 1. ), il est possible de déduire une valeur de  $x(^{13}C)_{NPe}$  à l'aide d'un fit basé sur l'équation 3.13. Les valeurs 64,9%, 62,1% et 69,3% ont été obtenues pour l'acide humique, l'alginate et les artémias respectivement. On observe donc une diminution par rapport à la valeur obtenue avec le mélange de nanoplastiques non marqués (71,1%), très faible dans le cas des artémias (2%) mais élevée pour l'acide humique et l'alginate avec 9% et 13% de variation, respectivement. Cette variation pourrait être expliquée par de faibles effets de matrice, pour l'acide humique et l'alginate, effets non significatifs dans le cas des artémias.

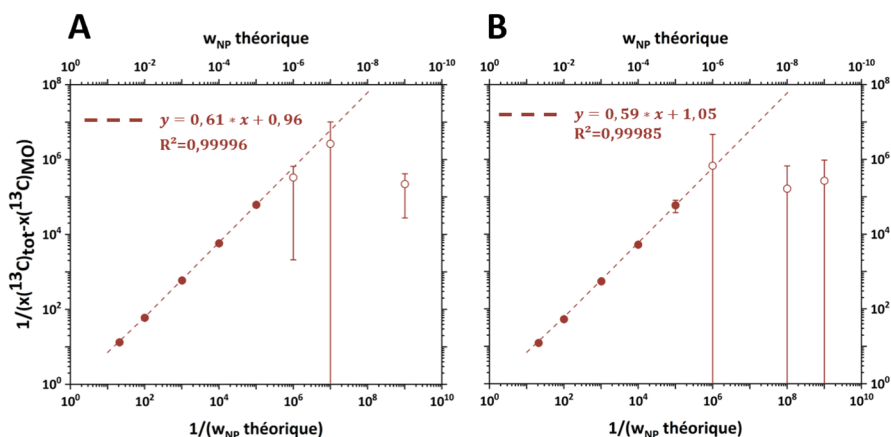


Figure 3.17: Variation de la signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( $^{13}\text{C}$ ) $_6$ -100%) et de matière organique modèle (A: acide humique et B: alginate), sous la forme de  $\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{MO}}}$ , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme  $\frac{1}{w_{\text{NP}}}$  ou de  $w_{\text{NP}}$ . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides n'ont pas été pris en comptes pour la régression linéaire.

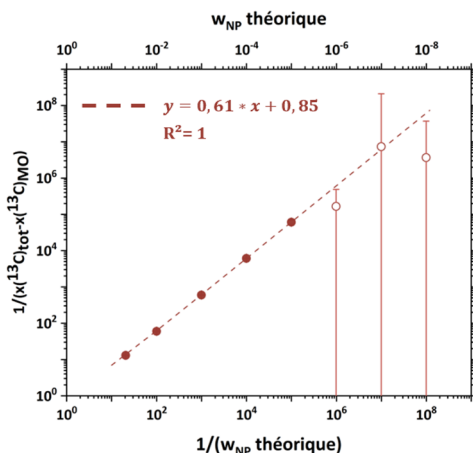


Figure 3.18: Signature isotopique de mélanges de nanoplastiques marqués (NP-( $^{13}\text{C}$ ) $_6$ -100%) et d'*Artemia sp.*, sous la forme de  $\frac{1}{x(^{13}\text{C})_{\text{tot}} - x(^{13}\text{C})_{\text{MO}}}$ , en fonction de la fraction en nanoplastiques marqués, sous la forme  $\frac{1}{w_{\text{NP}}}$  ou de  $w_{\text{NP}}$ . Les ronds pleins sont les données utilisées pour obtenir la régression linéaire en pointillées. Les ronds vides n'ont pas été pris en comptes pour la régression linéaire.

Les limites de détection ont pu être déterminées grâce à l'analyse des matrices sans nanoplastiques (cf. Tableau 3.6), à l'aide des équations 3.7 et 3.15. Les limites pour l'acide humique et l'alginate ont été calculées à 0,007 et 0,791 mg/g, respectivement, soit environ 4 et 50 fois moins que les LD obtenues avec les NP-( $^{13}\text{C}$ ) $_6$ -11% (cf. partie IV. 4. ). Pour les artémias, la limite de détection a été calculée à 0,002 mg/g. Cette étude permet donc de prouver qu'il est possible de quantifier des nanoplastiques dans des matrices organiques plus ou moins complexes, jusqu'à une certaine limite,

### CHAPITRE 3. Développement analytique des méthodes de quantification des nanoplastiques marqués à l'isotopie

dépendant principalement de l'enrichissement des nanoplastiques et de la reproductibilité des analyses de matrice.

#### IV. 5. 3. Détermination de la limite de détection en condition réelle

Afin de déterminer la limite de détection dans les conditions réelles, 15 artémias non contaminées ont été analysées individuellement par EA-IRMS. Ces analyses ont déterminé que les blancs avaient une signature isotopique de  $\delta^{13}C = -17,8 \pm 2,2 \text{ ‰}$ , c'est-à-dire une fraction isotopique de  $x(^{13}C) = 1,092 \pm 0,002 \text{ ‰}$ . A l'aide des équations 3.7, 3.8 et 3.13, les limites de détection et de quantification ont été calculées à 0,050 mg/g et 0,167 mg/g, respectivement. Si l'on compare avec les limites obtenues à l'aide d'artémias broyées, les LD et LQ obtenues dans la méthode finale, c'est-à-dire avec l'analyse d'artémias entières, sont plus élevées (25 fois plus environ), ce qui est expliqué par une variation de la signature isotopique naturelle de chaque artémia individuelle et donc du blanc. Le broyage des artémias dans la partie IV. 5. 2. a permis une homogénéisation des signatures isotopiques, et donc une très bonne reproductibilité des résultats d'EA-IRMS des blancs, contrairement aux analyses des artémias individuelles.

**Tableau 3.6:** Limites de détection et de quantification pour les différentes matrices et les différents nanoplastiques utilisés.

Limites	Acide humique		Alginate		Artemia sp. broyées	Artemia sp. entières
	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -11%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -100%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -11%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -100%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -100%	NP-( <sup>13</sup> C) <sub>δ</sub> -100%
LD (mg/g)	0,028	0,007	0,791	0,015	0,002	0,050
LQ (mg/g)	0,094	0,024	2,647	0,051	0,007	0,167

L'étude de l'accumulation des nanoplastiques par les artémias présentées dans le Chapitre 4 partie IV., a tout de même été faite en analysant des artémias individuelles. Il serait intéressant de faire les analyses plutôt sur des lots de plusieurs organismes homogénéisés, mais cela pose plusieurs problèmes. Premièrement, en analysant les artémias individuellement, on obtient de manière précise la quantité accumulée par organisme, ce qui ne serait possible que de façon moyennée en travaillant en lot. Deuxièmement, la quantité d'artémias à exposer serait nécessairement plus élevée et la quantité de nanoplastiques marqués à utiliser aussi, ce qui rendrait l'expérimentation plus coûteuse. Enfin et surtout, l'homogénéisation peut engendrer des contaminations, et des pertes d'échantillons, et donc un résultat faussé. Le biais éventuel peut être diminué en augmentant la quantité d'échantillons à homogénéiser, ce qui demande d'augmenter l'échelle des expérimentations, leurs coûts et le temps à y consacrer.

#### IV. 6. Bilan

Lors du développement de cette méthode, l'objectif était de montrer la possibilité de quantifier, en EA-IRMS, des nanoplastiques dans des matrices organiques complexes, afin de suivre leur accumulation dans les crustacés planctoniques *Artemia sp.*

Une étude a d'abord été faite de manière théorique et a montré qu'une telle quantification était possible pour des nanoplastiques marqués à l'isotopie, à condition de connaître les signatures isotopiques des nanoplastiques, et de la matrice, individuellement, ainsi que leur pourcentage de carbone respectif. Ces calculs théoriques ont aussi permis de réaliser une simulation visant à prévoir le potentiel de la méthode en fonction du taux et du type d'enrichissement des traceurs.

La théorie a ensuite été vérifiée par une mise en pratique, en EA-IRMS, avec l'analyse des nanoplastiques faiblement marqués en carbone  $^{13}\text{C}$ , mélangés avec des matrices organiques modèles : l'acide humique et l'alginate.

Le développement de la méthode finale a été fait avec des nanoplastiques fortement marqués en carbone  $^{13}\text{C}$ , pour une quantification en présence de matières organiques modèles, mais aussi, dans la matrice complexe que sont les artémias. La signature isotopique des nanoplastiques, trop enrichis pour être analysés directement par EA-IRMS, a été déduite de l'analyse de plusieurs mélanges de nanoplastiques marqués et non marqués ( $^{13}\text{C}_{NP} = 71,1 \pm 0,2 \%$ ). Les nanoplastiques NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% ont ensuite été quantifiés dans les différentes matrices, avec une bonne justesse pour les fractions supérieures à la limite de détection, *i.e.* 0,050 mg/g pour les artémias analysées entières (0,002mg/g pour les artémias broyées). La méthode analytique développée en EA-IRMS permet donc la quantification des nanoplastiques NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% dans différentes matrices organiques, ce qui a rendu possible l'étude de l'accumulation des nanoplastiques par *Artémia sp.*, présentée dans le Chapitre 4 partie IV.

### Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de développer deux méthodes visant à quantifier des nanoplastiques marqués à l'isotopie, dans des matrices complexes. La première méthode consiste à quantifier un fragment spécifique, produit lors de la pyrolyse incomplète du polystyrène, à l'aide de la Py-GC/MS, technique couramment utilisée pour quantifier les micro-et nanoplastiques. La seconde méthode, développée par EA-IRMS, permet de remonter à la concentration en nanoplastiques d'un mélange inconnu à partir de la signature isotopique de ce dernier, des signatures isotopiques et les pourcentages de carbone des nanoplastiques de la matrice non contaminée.

La quantification a été rendue possible, dans le cas de la Py-GC/MS, grâce à des calibrations externes, linéaires et répétables. Les limites de quantification ont été estimées à 18 ng pour les NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% par rapport à la matrice des daphnies, et à 47 ng pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, par rapport à la matrice des artémias. Aucun effet de matrice n'a été observé que ce soit par la présence de matrices organiques ou d'éventuels sels ajoutés dans le milieu.

Le développement de la méthode d'analyse par EA-IRMS a permis de montrer qu'une quantification de nanoplastiques marqués à l'isotopie était également possible avec cette technique, à la condition de connaître les signatures isotopiques et les pourcentages de carbone des nanoplastiques et de la matrice non contaminée. La démonstration a été réalisée de manière théorique mais aussi expérimentalement, grâce à des nanoplastiques faiblement, puis fortement enrichis en carbone  $^{13}\text{C}$ . Une méthode a également été développée pour déterminer la signature isotopique de nanoplastiques trop enrichis pour être analysés purs. La limite de quantification a été calculée, pour les NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, à 0,007 mg.g<sup>-1</sup> pour des artémias broyées et à 0,167 mg.g<sup>-1</sup> pour des artémias entières. Les effets de matrice ont également été étudiés, avec de faibles effets observés pour l'acide humique et l'alginate et pas d'effets significatifs pour les *Artemia sp.*

Les deux méthodes de quantification sont assez différentes puisque la première consiste à un étalonnage externe classique, tandis que l'autre est plus comparable à la dilution isotopique. Par conséquent, les résultats ne sont pas exprimés de la même manière pour les deux techniques, on obtient une masse de nanoplastiques en Py-GC/MS, et une fraction massique de nanoplastiques dans la matrice en EA-IRMS. Si on prend comme exemple une artémia qui a une masse sèche moyenne de 250 µg, la limite de quantification de la méthode par EA-IRMS correspondrait à 42 ng de NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, soit une limite légèrement plus faible que celle obtenue par Py-GC/MS. Cependant, l'EA-IRMS est potentiellement plus sensible aux contaminations. En effet, tout composé de carbone extérieur peut être une source de contamination, contrairement à l'analyse en Py-GC/MS qui vise un fragment spécifique aux nanoplastiques. De plus, la méthode par EA-IRMS nécessite l'obtention de quatre données expérimentales, ce qui accumule les incertitudes. Dans le chapitre 4, les deux méthodes ont été utilisées en conditions réelles. Dans la première partie, la Py-GC/MS a permis la quantification de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% accumulés par *Daphnia magna*. Et dans la deuxième partie, à la fois la Py-GC/MS et l'EA-IRMS a été utilisés pour quantifier des NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% accumulés par *Artemia sp.*, permettant ainsi une comparaison des deux méthodes.

---



---

CHAPITRE 4. ÉTUDE DE L'ACCUMULATION ET DE LA TOXICITÉ  
DES NANOPLASTIQUES CHEZ *DAPHNIA MAGNA* ET *ARTEMIA SP.*  
À L'AIDE DU MARQUAGE ISOTOPIQUE



---

**CHAPITRE 4. ETUDE DE L'ACCUMULATION ET DE LA TOXICITE DES NANOPLASTIQUES CHEZ *DAPHNIA*  
*MAGNA* ET *ARTEMIA SP.* A L'AIDE DU MARQUAGE ISOTOPIQUE** **129**

---

<b>Introduction</b> .....	<b>131</b>
<b>I. Bibliographie</b> .....	<b>132</b>
I. 1. Présentation des organismes d'étude .....	132
I. 2. Étude des interactions nanoplastiques - <i>Daphnia magna</i> .....	137
I. 3. Etude des interactions nanoplastiques - <i>Artemia sp.</i> .....	142
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	<b>144</b>
II. 1. Organismes d'étude .....	144
II. 2. Nanoplastiques testés .....	144
II. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de crustacés planctoniques.....	144
II. 4. Instruments et protocoles d'analyse .....	150
<b>III. Etude n°1 : Accumulation et toxicité des nanoplastiques marqués au deutérium vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i></b> .....	<b>152</b>
III. 1. Description des nanoplastiques utilisés : NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100% .....	152
III. 2. Résumé du développement analytique au Py-GC/MS .....	153
III. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i> .....	154
III. 4. Bilan de l'étude .....	163
<b>IV. Etude n°2 : Accumulation des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C par <i>Artemia sp.</i></b> .....	<b>164</b>
IV. 1. Description des nanoplastiques modèles utilisés : NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100% .....	164
IV. 2. Résumé du développement analytique à l'EA-IRMS.....	166
IV. 3. Accumulation des nanoplastiques par <i>Artemia sp.</i> .....	167
IV. 4. Bilan de l'étude .....	176
<b>Conclusion</b> .....	<b>178</b>

## Introduction

Dans le chapitre 2, des nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie ont été synthétisés en tirant profit d'une méthode mise en place au laboratoire. Cette méthode permet d'obtenir des nanoplastiques sans additifs (sans conservateur ni tensioactif) fonctionnalisés en surface par des groupements carboxyles qui miment l'oxydation des nanoplastiques vieillis en conditions naturelles. Le marquage a été fait de manière covalente au sein de la chaîne macromoléculaire par des atomes de deutérium ou de carbone  $^{13}\text{C}$  évitant ainsi la perte du marqueur.

Grâce au marquage isotopique des nanoplastiques, des méthodes de quantification ont été développées, dans le chapitre 3, à l'aide de deux techniques analytiques la Py-GC/MS et l'EA-IRMS pour permettre le suivi des nanoplastiques dans des matrices complexes tels que des organismes biologiques.

Il serait intéressant de quantifier l'accumulation de nanoplastiques dans de nombreuses espèces biologiques, mais nous avons choisi de nous concentrer sur deux espèces planctoniques, de niveau trophique bas : *Daphnia magna* et *Artemia sp.* Du fait de leur mode d'alimentation, ces organismes filtreurs ont un fort risque d'accumuler des micro- et nanoplastiques et de les transmettre à des espèces de niveaux trophiques supérieurs. Par ailleurs, ces deux espèces sont très utilisées dans les études d'écotoxicologie et sont considérées comme des organismes modèles pour ce genre d'études.

Dans ce chapitre, on se propose donc d'utiliser les nanoplastiques marqués à l'isotopie, synthétisés dans le chapitre 2, et les méthodes de quantification associées, développées dans le Chapitre 3, pour étudier l'accumulation des nanoplastiques et leur toxicité vis-à-vis de *Daphnia magna* et de *Artemia sp.*

Ce chapitre est donc divisé en deux parties. Dans la première partie, des daphnies ont été exposées à différentes concentrations de nanoplastiques marqués au deutérium (NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100%). Leur accumulation dans les organismes a été quantifiée par Py-GC/MS, avant et après différentes conditions de dépuración. La concentration des milieux a également été examinée ainsi que la toxicité des nanoplastiques.

Dans la seconde partie, l'accumulation de nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%) par des artémias a été quantifiée à l'aide de la méthode développée à l'EA-IRMS, ainsi que du Py-GC/MS, pour comparer les deux techniques. Les différences d'accumulation en fonction de la concentration des nanoplastiques ou du genre des individus ont été étudiées. Des cinétiques d'accumulation et de dépuración ont également été réalisées.

## I. Bibliographie

### I. 1. Présentation des organismes d'étude

#### I. 1. 1. *Daphnia magna*

Les daphnies sont des petits crustacés planctoniques d'eau douce, communément appelées « puces d'eau douce ». Leurs tailles peuvent varier de 1 mm à 5 mm à l'âge adulte. *Daphnia magna* est une espèce issue de la famille *Daphniidae* et plus particulièrement du genre *Daphnia sp.*, qui compte plus d'une centaine d'espèces différentes. Ce genre appartient à la classe des branchiopodes, et plus précisément, au sous-ordre des cladocères, c'est-à-dire des crustacés ayant une carapace non calcifiée, constituée en majorité de chitine.<sup>201</sup>

Les daphnies vivent en eau douce, en particulier dans les eaux calmes, à renouvellement lent, comme les lacs ou les étangs. Elles y ont une place centrale dans la chaîne alimentaire en étant la population principale du zooplancton et donc une source de nourriture privilégiée pour les espèces de niveaux trophiques supérieurs tels que les poissons planctivores. De plus, en tant que consommateurs primaires, les daphnies ont aussi un rôle important pour l'écosystème puisqu'elles limitent la prolifération d'algues.<sup>201</sup> En effet, les daphnies sont des organismes filtreurs, elles se nourrissent généralement d'algues planctoniques sous forme particulière avec des tailles variant pour la grande majorité entre 1 µm et 50 µm, et 70 µm dans des cas extrêmes.<sup>201</sup> La taille maximale des particules ingérées est en réalité dépendante de la taille de la daphnie elle-même, comme l'a montré Burns en 1968.<sup>202</sup>

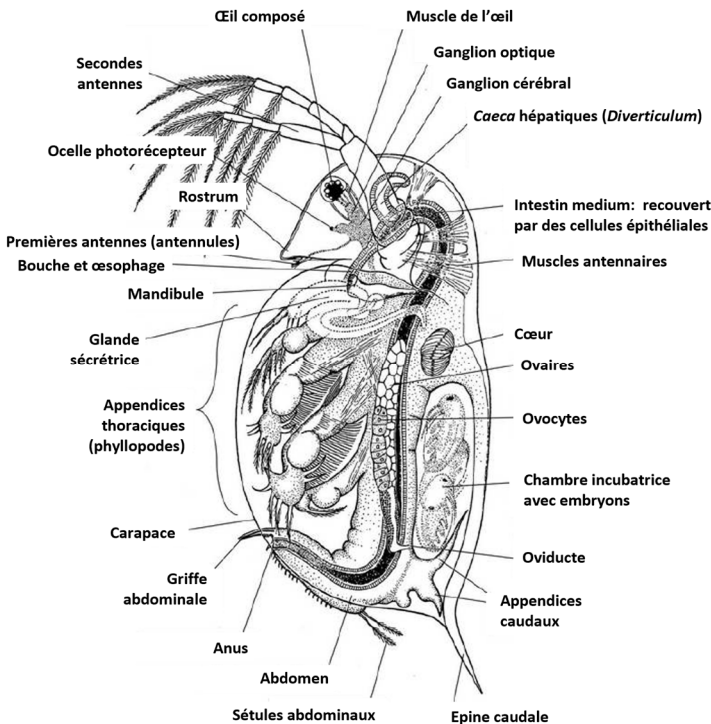


Figure 4.1: Schéma anatomique d'une *Daphnia sp.* femelle adulte. Adapté de Ebert, 2005 <sup>201</sup>

CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

L'anatomie d'une daphnie femelle est présentée dans la Figure 4.1. La nourriture est collectée par les appendices thoraciques, qui produisent un courant permettant de la transférer dans l'organisme au niveau de la bouche. Le tube digestif des daphnies est composé de trois parties : l'œsophage, l'intestin moyen et l'intestin postérieur. La nourriture est transférée le long du tube digestif jusqu'à l'anus par des mouvements péristaltiques, mais aussi à l'aide de la pression apportée par l'entrée de nouvelle nourriture.<sup>201</sup>

Une différence en taille est observée entre les femelles et les mâles : ces derniers sont plus petits et possèdent d'autres distinctions anatomiques comme des antennules (première paire d'antennes) plus développées. Ces dernières servent d'organe sensoriel, tandis que la seconde paire d'antennes permet aux daphnies de se déplacer dans la colonne d'eau, via une nage par à-coups très caractéristique qui leur donne leur nom de « puces d'eau ».

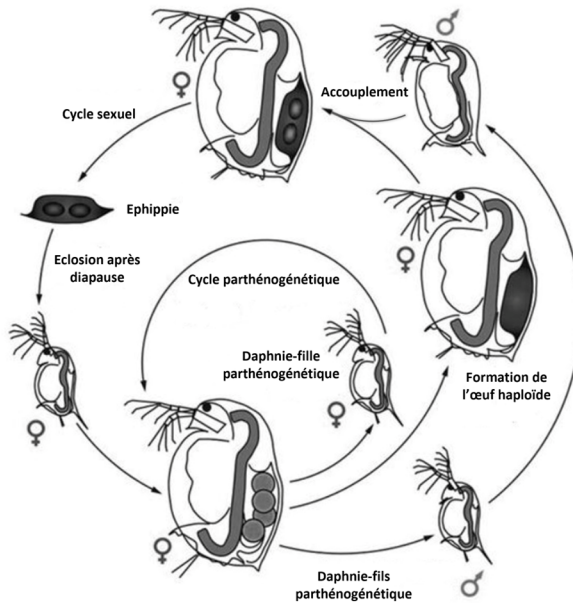
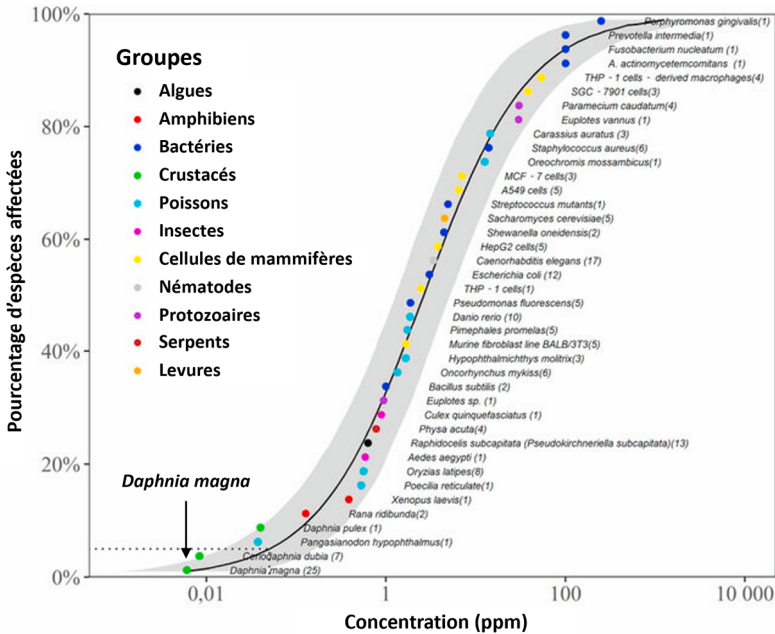


Figure 4.2: Schéma du système de reproduction de *Daphnia sp.* Adapté de Ebert, 2005<sup>201</sup> et Turk, 2011<sup>203</sup>

Les daphnies peuvent se reproduire de deux manières différentes, représentées dans la Figure 4.2, ci-dessus. Une reproduction asexuée, par parthénogenèse, permet aux femelles de produire des œufs dans leur chambre incubatrice. Les œufs vont éclore dans la cavité, mais ne vont être expulsés dans le milieu qu'après une période de développement, qui dure environ 3 jours. Les nauplii (nouveau-nés) résultants peuvent être des femelles ou des mâles, en fonction des conditions environnementales. La deuxième méthode de reproduction est sexuée. Après accouplement, les femelles vont produire des œufs dormants, encapsulés dans une structure rigide appelée éphippie ou *ephippium*. Chaque éphippie peut contenir jusqu'à deux œufs qui deviendront après éclosion des daphnies femelles. Ces œufs peuvent ainsi « dormir », résister à des conditions environnementales difficiles, et éclore quand les conditions sont plus propices. A l'heure actuelle, ces éphippies sont particulièrement utiles pour la mise en place de tests de toxicité rapides, tels que proposés par les

**CHAPITRE 4.** Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

Daphtoxkits (Daphtoxkit F™, MicroBioTests Inc., Belgique, par exemple). En effet, les œufs peuvent être transportés, conservés facilement et permettent de faire éclore, sur demande, uniquement des femelles, ce qui évite les effets de genre sur les études de toxicité.



**Figure 4.3:** Courbe de distribution de la sensibilité des espèces à des nanoparticules d'argent. *Daphnia magna* est décrit comme l'espèce la plus sensible. Repris de Liu *et al.*<sup>204</sup>

Que ce soit à partir d'éphippies ou de cultures en laboratoire, les daphnies sont depuis longtemps considérées comme des organismes modèles pour les études de toxicité, et leur utilisation est recommandée dans de nombreuses normes<sup>205–207</sup>. En plus de leur mode de reproduction, ces organismes offrent plusieurs avantages. Les daphnies ont un temps d'incubation et un cycle de vie assez court (3 jours), ce qui permet de les utiliser tant pour des tests de toxicité à court terme, en ne considérant qu'une génération, que pour les tests à long terme sur plusieurs générations.<sup>204,208</sup> La parthénogénèse permet aussi d'avoir des individus génétiquement identiques. Par ailleurs, leur petite taille permet de tester de nombreux individus dans des milieux d'étude de taille restreinte et de manière peu coûteuse. De plus, les daphnies sont des organismes dont la biologie a été très étudiée et leur génome a été publié, ce qui permet aux écotoxicologues de faire des études génomiques approfondies en lien avec la présence de polluants.<sup>204,209</sup> Enfin, et surtout, le principal avantage de ces organismes pour les études écotoxicologiques est qu'ils sont très sensibles aux polluants, comme on peut le voir dans la Figure 4.3 dans le cas de nanoparticules d'argent, ce qui permet une plus grande sensibilité des tests de toxicité.<sup>204,208</sup>

### I. 1. 2. *Artemia sp.*

Les artémias, ou artémies, sont regroupées dans le genre *Artemia sp.*, issu de la famille *Artemiidae*. Comme les daphnies, ces organismes sont des crustacés planctoniques, appartenant à la classe des branchiopodes. Cependant, les artémias appartiennent à l'ordre des anostracés, qui se distinguent par leur corps allongé, cylindrique et dépourvu de carapace.<sup>210</sup>

En comparaison avec les daphnies, les différentes espèces d'artémias sont plus difficiles à différencier et ont fait beaucoup débat, en particulier pour les organismes vivant sur les côtes méditerranéennes.<sup>211</sup> A l'origine, l'espèce prédominante dans la région était l'espèce bisexuée *Artemia salina* (cohabitant avec des souches parthénogénétiques), mais depuis l'implantation de l'espèce bisexuée *Artemia franciscana*, originaire du continent américain, cette dernière a rapidement pris le pas sur les autres espèces et *Artemia salina* n'est probablement plus présente.<sup>212</sup> Par commodité, dans la suite de l'étude, nous garderons l'appellation générale du genre : *Artemia sp* pour désigner les organismes originaires de cette région.

Les artémias vivent dans des milieux à haute salinité, comme les marais salins, les lacs salés ou les lagunes. Globalement, on peut classer ces milieux en deux catégories. Les milieux thalassohalins présentent une composition proche de l'eau de mer, avec une prédominance de chlorure de sodium. C'est le cas des lagunes, des marais salins, ou encore de certains lacs comme le *Great Salt Lake*, situé aux Etats-Unis. Les milieux athalassohaliens, situés à l'intérieur des terres, ont au contraire une composition ionique très différente de l'eau de mer, avec des prédominances d'autres ions tels que des sulfates, carbonates, ou encore du potassium. Les artémias peuvent donc résister à des compositions ioniques différentes mais aussi à des salinités très variables, grâce à un système d'osmorégulation très performant. Cette capacité leur permet de vivre dans des milieux dits hostiles et d'échapper à de nombreux prédateurs.<sup>213</sup>

Comme les daphnies, les espèces du genre *Artemia sp.* sont des consommateurs primaires qui ont une place importante dans leur écosystème : tout en étant une source de nourriture pour des espèces de niveaux trophiques supérieurs, tels que les flamants roses, ils permettent d'éviter la prolifération d'algues. En effet, ces organismes filtreurs se nourrissent principalement d'algues, mais n'étant pas sélectifs, ils peuvent filtrer tous types de particules, si elles ne dépassent pas un seuil de taille de 50 µm environ.<sup>213</sup>

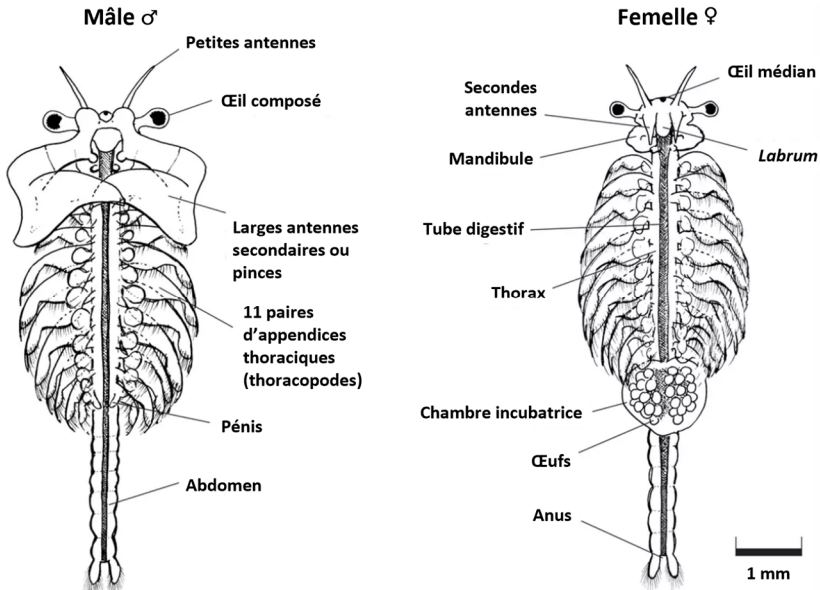


Figure 4.4: Schéma anatomique de *Artemia franciscana* adultes avec différenciation entre mâles (à gauche) et femelles (à droite). Adapté de Dockery et Tomkins, 2000<sup>214</sup>

L'anatomie des artémias est présentée dans la Figure 4.4. Les artémias possèdent 11 paires d'appendices thoraciques qui leur permettent de créer un courant, leur servant à se déplacer, grâce à une nage sur le dos, mais aussi à amener la nourriture vers la bouche (située sous le *labrum*). La nourriture est ensuite digérée au niveau du tube digestif, qui traverse le corps en son long et se termine par l'anus. Les artémias mesurent entre 8 et 10 mm de long environ, à l'âge adulte. Les femelles sont généralement plus grandes que les mâles, et portent les œufs dans la chambre incubatrice. Les mâles sont reconnaissables par leurs grandes antennes secondaires qui leur servent à s'accrocher à la femelle pendant l'accouplement.<sup>213,214</sup>

Comme les daphnies, les artémias ont plusieurs moyens de reproduction. Certaines souches sont dites bisexuelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent se reproduire par accouplement entre un mâle et une femelle, et certaines souches peuvent être parthénogénétiques (elles sont regroupées sous l'appellation *Artemia parthenogenetica*). En fonction des conditions environnementales, les artémias femelles peuvent produire soit des œufs qui vont éclore dans la chambre incubatrice (dans des conditions plutôt douces), soit des œufs qui vont éclore rapidement dans le milieu (conditions intermédiaires), ou enfin, si les conditions sont très dures, elles peuvent produire des cystes, c'est-à-dire, des œufs dormants qui peuvent rester en dormance jusqu'à ce que les conditions soient suffisamment clémentes pour éclore. Les organismes éclosent sous forme de larves, appelées nauplii (nauplius au singulier), qui vont ensuite grandir et muer plusieurs fois, pour devenir des artémias adultes.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

Comme les daphnies, les artémias sont très utilisées pour les études écotoxicologiques, et la production de cystes, à l'éclosion rapide et contrôlable, très intéressante pour la mise en place de tests rapides, font sûrement partie des raisons qui expliquent cet intérêt.<sup>215,216</sup> Ce sont aussi des organismes peu coûteux à produire, qui permettent d'obtenir des résultats reproductibles, même s'ils sont moins sensibles aux polluants que les daphnies.<sup>208</sup>

Par ailleurs, les artémias ont une place importante dans certaines activités humaines. Dans les marais salins, elles vont réguler la présence des algues pour permettre une récolte de sel de qualité optimale.<sup>216</sup> Dans le domaine de l'aquaculture, les artémias sont une référence en matière de nourriture vivante, indispensable pour certains juvéniles de poissons ou crustacés. Généralement, elles sont utilisées sous leur forme larvaire (nauplius) dont la production est plus rapide.<sup>216</sup> Il est donc important de comprendre les mécanismes d'accumulation des nanoplastiques chez *Artemia sp.* puisqu'en cas de transfert trophique, une grande partie de la population humaine serait probablement concernée.

### I. 2. Étude des interactions nanoplastiques - *Daphnia magna*

*Daphnia magna* étant une espèce particulièrement utilisée pour les études d'écotoxicologie pour les raisons évoquées précédemment, une multitude de travaux a été faite sur l'écotoxicité des nanoplastiques vis-à-vis des daphnies. Ces publications ont été recensées, et leurs résultats discutés, dans la review de Kokalj *et al.*, publiée en 2023.<sup>217</sup>

Beaucoup de travaux ont aussi étudié l'accumulation des nanoplastiques par les daphnies, conjointement à l'étude de leur toxicité, ou non. Les principales publications traitant de ce sujet ont été regroupées dans le Tableau 4.1. Quinze publications ont été recensées entre les années 2009 et 2023. Parmi ces travaux, quatorze ont été faits avec des particules de polystyrène (en homopolymère ou copolymère), une seule publication a étudié un polymère différent : le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Près des deux tiers des études ont une approche qualitative (ou semi-quantitative, pour deux d'entre-elles <sup>139,218</sup>), notamment pour confirmer et localiser l'accumulation des nanoplastiques dans les organismes, tandis que les cinq autres publications,<sup>138,219–222</sup> dont trois parues en 2023, visent à quantifier de manière plus précise cette accumulation.

L'exposition des daphnies aux nanoplastiques utilise des nanoplastiques non marqués dans deux articles : Saavedra *et al.* <sup>223</sup> et Kaur *et al.* <sup>224</sup>. Dans la première publication, seule la microscopie optique a été utilisée pour localiser les zones d'accumulation des nanoplastiques tandis que dans la deuxième publication, les auteurs ont combiné de l'imagerie TEM, mieux résolue, couplée à de la spectroscopie Raman pour confirmer la présence de polystyrène. Cependant, ces techniques restent pour l'instant limitées. Pour toutes les autres publications, les auteurs ont eu recours à des techniques de marquage afin de suivre plus précisément les nanoplastiques.

L'utilisation de fluorophores est largement majoritaire puisqu'elle concerne onze des quinze études. Ceci peut s'expliquer par le fait que des nanoplastiques fluorescents commerciaux sont disponibles à l'achat depuis longtemps, et qu'ils peuvent être analysés par des techniques largement utilisées dans les laboratoires de biologie. Avec de tels marqueurs, la microscopie de fluorescence permet de localiser les nanoplastiques <sup>87,131,134,225,226</sup> et l'accumulation dans les organismes peut aussi être quantifiée par spectrophotométrie de fluorescence ou en utilisant un lecteur de plaques en



#### CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

fluorescence.<sup>219,220,222,227</sup> Cependant, comme mentionné dans le Chapitre 1, partie IV. 1. , l'utilisation de ce type de marquage peut mener à des conclusions erronées. Tout d'abord, les tissus biologiques peuvent produire eux-mêmes de la fluorescence. Ce phénomène a été décrit notamment par Booth *et al.* qui ont observé de l'autofluorescence dans les daphnies témoins.<sup>131</sup> Par ailleurs, si le marqueur fluorescent n'est pas lié de façon covalente au polymère, il peut être relargué sous l'effet d'un changement de pH par exemple, ou à cause d'affinités plus fortes pour d'autres composés.<sup>133</sup> C'est le cas dans l'étude de Rosenkranz *et al.*<sup>219</sup> qui observait, en 2009, de la fluorescence, non seulement dans le tube digestif des daphnies adultes, mais aussi dans leurs poches lipidiques, ce qui indiquerait, selon les auteurs, une translocation des microplastiques de 1000 nm (et des nanoplastiques de 20 nm) au travers de la barrière épithéliale du tube digestif, ce qui va à l'encontre de nombreuses autres publications. Ces conclusions ont été remises en cause, en 2019, par Schür *et al.*<sup>134</sup>, qui, en répétant l'expérience, ont montré que la fluorescence observée dans les poches lipidiques était due à la migration du marqueur fluorescent lipophile et non à la présence de micro- ou nanoplastiques. Cette publication, ainsi que celle de Catarino *et al.*<sup>133</sup> (impliquant des larves de poissons-zèbres), remettent en cause d'autres publications telles que celles de Nasser *et al.*, 2016<sup>228</sup>, Brun *et al.*<sup>225</sup>, Chae *et al.*<sup>226</sup>, Reynolds *et al.*<sup>218</sup>, ou encore Rist *et al.*<sup>220</sup> qui n'ont pas purifié les plastiques modèles marqués, ni évalué le relargage des fluorophores ou mesuré l'autofluorescence des tissus.

Enfin, en ce qui concerne les études de quantification par la fluorescence, en plus de la vérification des points mentionnés précédemment, une validation de méthode de quantification doit être effectuée, pour la robustesse et la fiabilité des analyses. Ainsi, Rist *et al.*<sup>220</sup> indique qu'un simple broyage des daphnies (comme faite par Rosenkranz *et al.*<sup>219</sup>) ne permet pas un recouvrement total des plastiques modèles marqués. Une digestion des tissus est nécessaire. Par ailleurs, une attention particulière doit être apportée aux conditions dans lesquelles sont effectuées les calibrations pour éviter toute interférence (due au pH, sels...) conduisant à une mauvaise quantification des nanoplastiques dans les échantillons biologiques.<sup>222,227</sup>

Si la fluorescence reste un type de marquage très utilisé, d'autres marqueurs ont été développés en laboratoire notamment pour étudier l'accumulation des nanoplastiques chez *Daphnia magna*. Parmi ces marqueurs, on trouve deux publications qui ont utilisé des nanoplastiques marqués en leur cœur avec des métaux : l'aluminium (Al), en combinaison avec des fluorophores,<sup>139</sup> et le palladium (Pd)<sup>138</sup>. Dans les deux cas, après exposition, les échantillons ont été digérés à l'aide d'acide nitrique (et éventuellement de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>139</sup>), et analysés par ICP-MS. Une analyse de la quantité de Pd dans les nanoplastiques a permis à Tamayo-Balda *et al.* de convertir les résultats en masse de nanoplastiques.<sup>138</sup> Dans le cas de Vicentini *et al.*, cette conversion n'a pas été réalisée, les concentrations en aluminium ont été utilisées directement pour des comparaisons entre les différentes conditions, ainsi qu'avec les intensités de fluorescence, grâce au double marquage. Les deux méthodes ont obtenus des résultats cohérents pour les deux nanoplastiques fonctionnalisés mais pas pour les non fonctionnalisés.<sup>139</sup>

Enfin, une dernière technique de marquage a été utilisée sur les daphnies. Zhang *et al.*<sup>221</sup> ont eu recours à des lanthanides (dans leur cas : 78% lutétium (Lu), 20% ytterbium (Yb) et 2% erbium (Er)). Comme vu dans le Chapitre 1, partie IV. 3. , cette famille du tableau périodique a la capacité de convertir des photons de basse énergie (absorption dans le proche infrarouge), en photons d'énergie plus élevée (émission dans le visible), ce qui permet de synthétiser des particules dites « à conversion ascendante » ou « *upconverting* » en anglais. Comme les nanoplastiques fluorescents,

#### CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

les nanoplastiques marqués aux lanthanides peuvent être suivis par des techniques d'imagerie. Pour les daphnies, les auteurs ont utilisé un montage de « *Time-gated imaging* » ou d'imagerie temporelle, en français, et ont fait une calibration pour quantifier les nanoplastiques.

La majorité des travaux cités précédemment ont démontré une accumulation préférentielle des nanoplastiques dans le tube digestif.<sup>87,131,218,219,222-227</sup> Sur les quinze publications portant sur l'accumulation, huit mentionnent donc une étape de dépuración après l'exposition afin de « vider » le tube digestif des daphnies avant quantification des NP accumulés. Pour cinq d'entre-elles, la dépuración a été faite sans ajout de nourriture, alors que pour les trois autres publications, la dépuración en présence d'algues a été testée. La présence d'algues semble fortement améliorer l'excrétion des NP lors de la dépuración (par exemple une diminution de 88% en présence d'algues a été observée par *Rist et al.*,<sup>220</sup> contre 29% en absence d'algues).<sup>220,227</sup> La question de la translocation est en revanche toujours ouverte, avec sans doute, un effet de la taille. Wang et Wang<sup>222,227</sup> ont déterminé, après dissection, que plus de 50% des nanoplastiques de 200 nm de diamètre étaient localisés dans le tube digestif, ce qui laisse à penser qu'il y aurait tout de même une forte translocation, mais on peut se demander si la dissection à si petite échelle n'engendre pas des pertes. Zhang *et al.*<sup>221</sup>, quant à eux, ont observé, en imagerie TEM, des nanoplastiques de 49 nm, localisés dans les cellules épithéliales et dans la structure interne de la carapace, ce qui indiquerait une translocation.

La quantité de nanoplastiques accumulés semblent dépendre de plusieurs paramètres. Tout d'abord, la fonctionnalité de surface : les NP fonctionnalisés avec des groupements NH<sub>2</sub> sont retrouvés en plus grande quantité que ceux fonctionnalisés avec des groupements COOH,<sup>222,224</sup> et de même, Vicentini et al. ont retrouvé un plus grand nombre de nanoplastiques fonctionnalisés par l'acide palmitique, comparé aux non fonctionnalisés.<sup>139</sup> Les deux travaux ayant étudié l'influence de la présence d'une corona ou éco-corona sur les NP ont chacun observé une accumulation plus forte en présence de biofilm.<sup>223,228</sup> Enfin, dans le cas de la présence de nourriture lors de l'exposition, et donc de compétition entre nourriture et NP, l'accumulation semble être fortement réduite.<sup>227</sup>

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

**Tableau 4.1:** Synthèse bibliographique de l'étude de l'accumulation des NP chez *D. magna*

Référence	Type d'analyse	Polymère	Marquage	Fonctionnalité de surface	Taille	Additifs	Purification des NP avant exposition
Rosenkranz <i>et al.</i> , 2009 <sup>219</sup>	<b>Quantitatif + Imagerie</b>	PS	Fluorescence	-COOH	20nm	Pas spécifié	Pas de purification
Booth <i>et al.</i> , 2016 <sup>131</sup>	Qualitative (Imagerie)	PMMA PMMA- PSMA	Fluorescence	Pas spécifiée	125nm 86nm	SDS	Dialyse : Eau déionisée
Nasser <i>et al.</i> , 2016 <sup>228</sup>	<b>Semi-quantitatif + imagerie</b>	PS	Fluorescence	-COOH	89nm	Pas spécifié	Pas de purification
Brun <i>et al.</i> , 2017 <sup>225</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Fluorescence	Pas spécifiée	25nm	Pas spécifié	Pas de purification
Rist <i>et al.</i> , 2017 <sup>220</sup>	<b>Quantitatif</b>	PS	Fluorescence	Pas spécifiée	100nm	Tween-20 NaN <sub>3</sub>	Pas de purification
Chae <i>et al.</i> , 2018 <sup>226</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Fluorescence	Pas spécifiée	51nm	Tensioactif NaN <sub>3</sub>	Pas de purification
Pikuda <i>et al.</i> , 2019 <sup>87</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Fluorescence	-COOH	20nm 200nm	NaN <sub>3</sub>	Dialyse : Eau déionisée 5j
Reynolds <i>et al.</i> , 2019 <sup>218</sup>	<b>Semi-quantitatif + Imagerie</b>	PS	Fluorescence	Pas spécifiée	100nm	Tensioactif	Pas de purification
Saavedra <i>et al.</i> , 2019 <sup>223</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Non marqué	-COOH -C(=NH)-NH <sub>2</sub>	200nm	Pas de tensioactifs	Pas de purification
Schür <i>et al.</i> , 2019 <sup>134</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Fluorescence	-COOH	20nm	Pas spécifié	Pas de purification
Vicentini <i>et al.</i> , 2019 <sup>139</sup>	<b>Semi-quantitatif + Imagerie</b>	PS	Aluminium + Fluorescence	Pas fonctionnalisée Acide palmitique	90nm	SDS	Pas de purification
Kaur <i>et al.</i> , 2023 <sup>224</sup>	Qualitative (Imagerie)	PS	Non marqué	-COOH -NH <sub>2</sub>	170nm 130nm	Pas spécifié	Dialyse : Eau Milli-Q® 72h à 4 °C
Tamayo-Belda <i>et al.</i> , 2023 <sup>138</sup>	<b>Quantitatif + Imagerie</b>	PS	Palladium (Pd)	Pas spécifiée	286nm	SDS KPE	Pas de purification
Wang <i>et al.</i> , 2023 <sup>222 et 227</sup>	<b>Quantitatif + Imagerie</b>	PS- P(MMA- AA)	Fluorescence	-COOH -NH <sub>2</sub>	200nm	SDBS	Centrifugation : Eau 3 fois
Zhang <i>et al.</i> , 2023 <sup>221</sup>	<b>Imagerie quantitative</b>	PS	Lanthanides (Lu, Yb, Er)	Pas spécifiée	49nm	Acide oléique	Centrifugation : Ethanol/eau déionisée 10000 rpm

Abréviations : lecteur de plaques en fluorescence (LPFluo), microscopie de fluorescence (MicroFluo), microscopie optique (MicroOpt),

\* : Concentration aussi disponibles en #/L.

(Suite à la page suivante)

**CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia* sp. à l'aide du marquage isotopique**

Tableau 4.1 (suite)

Concentration d'exposition	Temps exposition max	Temps dépuración max	Technique d'analyse	Résultats Accumulation/Dépuración	Ref
2 µg/L	Qualitatif : 24 h Quantitatif : 4 h	4 h : milieu sans NP	LPFluo MicroFluo	<b>Après exposition : 0,055 ng/animal</b> <b>Après dépuración : 0,032 ng/animal</b> NP dans le TD et gouttelettes lipidiques.	219
1 mg/L	48 h	24 h : milieu sans NP	MicroFluo	Accumulation rapide dans le TD et rapide dépuración et détection de NP dans les fèces.	131
10 mg/L	3 h	6 h : milieu sans NP	LPFluo MicroFluo	Accumulation corrélée au temps d'exposition, plus forte des NP recouverts d'une éco-corona. Dépuración importante au bout de 6 h.	228
5mg/L* + algues	A: Embryogénèse + 3 j B: Phases 1 à 4 de l'embryogénèse	A: Pas de dépuración B: A partir de la phase 5, avec algues	MicroFluo	Accumulation visible dans le TD des adultes mais pas de translocation. Accumulation visible dans les gouttelettes lipidiques des embryons. Confirmée par expositions ex-vivo.	225
A: 1 mg/L* B1: 0,1 mg/L* B2: 0,5 mg/L* B3: 1 mg/L*	A :24 h B :21 j	A: 24 h : milieu sans NP avec et sans algues B: Pas de dépuración	SpectroFluo MicroFluo	A: <b>après exposition : 0,17 µg/animal*</b> <b>Dépuración sans algues : 0,12 µg/animal*</b> <b>Dépuración avec algues -93%</b> B1: <b>après exposition : 0,09 µg/animal</b> B2: <b>après exposition : 1,06 µg/animal</b> B3: <b>après exposition : 2,42 µg/animal</b>	220
Via algues exposées à 50 mg/L- 72h	5 h	Pas de dépuración	MicroFluo	Observation des NP à la surface des algues et dans le TD des daphnies.	226
100 ppm*	49 h	Pas de dépuración	MicroFluo	Accumulation observée dans le TD, dans le cas les NP dialysés. Observation de ruptures dans le TD pour les non dialysés.	87
[10; 100] mg/L	24 h	Pas de dépuración	SpectroRaman LPFluo MicroFluo	Détection de NP dans le TD, pour toutes les concentrations d'exposition mais pas dans d'autres organes.	218
[10; 400] mg/L	48 h	Pas de dépuración	MicroOpt	NP dans le TD et gouttelettes lipidiques. Accumulation plus forte avec corona.	223
2 µg/L et 2 mg/L	24 h	Pas de dépuración	MicroFluo	Mise en évidence de fluorescence dans les gouttelettes lipidiques, non associée aux NP.	134
A :1 mg/L B: 50 mg/mL	24 h	A: 24 h : milieu sans NP B: Pas de dépuración	ICP-MS MicroFluo MicroOpt	Accumulation grande avec acide palmitique + Fluo (3x) et fluo seul (2x). Confirmée par ICP-MS et fluorescence.	139
224 mg/L	4 h	Pas de dépuración	MicroRaman MET	Accumulation dans le TD.	224
A :6 mg/L Microscopie : 10 et 80 mg/L	48 h	Pas de dépuración	ICP-MS MET MicroOpt	<b>Milieu statique :</b> <b>0.14 ± 0.06 µg/animal*</b> <b>Milieu dynamique :</b> <b>0.16 ± 0.04 µg/animal*</b>	138
A :0,05 B :0,5 mg/L avec et sans algues C :0,1 mg/L*	8 h	8 h avec et sans algues	LPFluo MicroFluo MicroOpt	A: <b>après exposition: 2,3;1,9 µg/mg<sub>TD</sub>(NH<sub>2</sub>;COOH)</b> B: <b>après exposition: 2,7;2,3 µg/mg<sub>TD</sub>(NH<sub>2</sub>;COOH)</b> Exposition avec algues : -69% ; -82% (NH <sub>2</sub> ;COOH) + de 50% des NP quantifiés dans le TD. BCF + élevés pour les plus faibles concentrations. C : <b>Dépuración avec algues : ~ -70% (vs ~ -10%)</b>	222 et 227
0,5 mg/L	24 h	48 h milieu sans NP	TGI	<b>Après exposition : ~12 ng/animal.</b> <b>Après dépuración : ~3 ng/animal.</b> Observation de NP internalisés (via TEM) après 48 h d'exposition à 1 mg/L.	221

*Spectrophotomètre de fluorescence (SpectroFluo), spectroscopie de raman (SpectroRaman), tube digestif (TD), Time-gated Imaging (TGI).*

### I. 3. Etude des interactions nanoplastiques - *Artemia sp.*

Bien que moins couramment utilisées par rapport aux daphnies, les artémias restent des organismes de référence pour les tests écotoxicologiques.<sup>215</sup> Nous avons recensé six publications, publiées entre 2016 et 2022, faisant état de l'accumulation de nanoplastiques par *Artemia sp.*<sup>229-234</sup> Les informations clés ont été regroupées dans le Tableau 4.2. Tous les travaux portent sur l'espèce *Artemia Franciscana*, et se concentrent principalement sur la toxicité des débris plastiques, même si le sujet de l'accumulation est aussi traité. Pour cela, les auteurs font tous appel à des nanosphères de polystyrène fluorescentes commerciales (et dans un cas, marquées par un colorant bleu). Parmi les six publications, quatre d'entre elles ont une approche purement qualitative, utilisant des techniques d'imagerie pour localiser les nanoplastiques. Dans les deux autres publications, l'objectif des auteurs était de quantifier les nanoplastiques accumulés par *Artemia sp.* La quantité accumulée par les artémias a été calculée de manière indirecte, à partir d'analyses du milieu d'exposition, soit par cytométrie en flux ou à l'aide d'un lecteur de plaques en fluorescence.<sup>232,234</sup> Dans les deux cas, aucun test d'adsorption, en absence d'organismes, n'est mentionné et dans le cas de Sendra *et al.*, aucun détail n'est donné sur la méthode de quantification par cytométrie de flux, développée pour discriminer le signal des nanoplastiques de celui des microalgues utilisées pour nourrir les organismes.<sup>232</sup>

Nous avons vu dans la partie I. 2. et dans le Chapitre 1 partie IV. 1, que le marquage par fluorescence peut amener à des résultats faussés notamment à cause de la lixiviation des fluorophores dans les échantillons.<sup>133,134</sup> Parmi les six études utilisant des nanoplastiques fluorescents, une seule s'est intéressée au relargage des marqueurs, en comparant le signal d'une dispersion avant et après une filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ .<sup>234</sup> Pour les autres publications, aucun test n'a été fait, et dans tous les cas, les nanoplastiques semblent avoir été utilisés sans purification préalable à l'exposition.

En termes de résultats, toutes les publications reportent de l'accumulation de nanoplastiques par les artémias dans leur tube digestif, accumulation d'autant plus forte pour les nanoparticules fonctionnalisées par des groupements COOH. De l'adsorption sur l'extérieur des organismes (mandibules, appendices...) a aussi été observée, en particulier pour les nanoparticules fonctionnalisées par des groupements NH<sub>2</sub>. En termes de dépuration, les nanoplastiques semblent bien être, au moins en partie, éliminés pendant la phase de dépuration et parfois déjà pendant la phase d'exposition.<sup>231</sup> Bergami *et al.* ont aussi observé une différence de comportement, par rapport à la dépuration, en fonction de la fonctionnalisation (dépuration plus efficace pour les nanoparticules fonctionnalisées par des groupements NH<sub>2</sub>).<sup>229</sup>

Compte tenu du faible nombre de publications portant sur l'accumulation des nanoplastiques par *Artemia sp.*, malgré la place importante que ces organismes ont dans certaines activités humaines, telle que l'aquaculture, il existe un réel besoin d'études supplémentaires, en particulier, pour faire état de l'accumulation des nanoplastiques chez ces crustacés, de manière quantitative et à l'aide de méthodes analytiques fiables.

Tableau 4.2: Synthèse bibliographique de l'étude de l'accumulation des NP chez *Artemia sp.*

Type d'analyse	Polymère	Marquage	Fonctionnalité de surface	Taille	Additifs	Purification	Concentration d'exposition	Temps d'exposition maximal	Temps de dépuración maximal	Technique d'analyse	Résultats Accumulation/Dépuración	Référence
Qualitatif (imagerie)	PS	Fluorescence	-COOH -NH <sub>2</sub>	40 nm 50 nm	Pas spécifié	Pas de purification	5–100 µg/ml	48 h	24 h: milieu sans NP et sans nourriture	MicroFluo MicroOpt	COOH: accumulation forte dans le TD forte. NH <sub>2</sub> : accumulation moins forte dans le TD mais plus d'absorption sur l'extérieur des larves. COOH: dépuración faible. NH <sub>2</sub> : dépuración forte.	Bergami et al., 2016 <sup>229</sup>
Qualitatif (imagerie)	PS	Fluorescence	A: COOH B: NH <sub>2</sub>	40 nm 50 nm	Pas spécifié	Pas de purification	A: 10 µg/ml B: 5 et 10 µg/ml	14 jours	Pas de dépuración	MicroFluo MicroOpt	Accumulation dans le TD forte pour les COOH et présence dans les fèces.	Bergami et al., 2017 <sup>230</sup>
Qualitatif (imagerie)	PS	Fluorescence +Colorant bleu	Pas spécifié	100 nm	Pas spécifié	Pas de purification	0,001-10 mg/L	48 h	Pas de dépuración	MicroFluo	Accumulation dans le TD. Ingestion et excrétion en continu.	Gambardella et al., 2017 <sup>231</sup>
Semi-quantitatif + Imagerie	PS	Fluorescence	Pas spécifié	100 nm	Pas spécifié	Pas de purification	0,006 et 0,6 mg/L avec et sans nourriture	A: 24 h B: 3-5 h C: 24 h	A: 2 h avec nourriture B: Pas de dépuración C: 24 h avec nourriture	CMF MicroFluo	Accumulation dans le TD et adsorption sur les appendices et mandibules. Présence de NP dans les fèces après 24 h de dépuración donc durée non suffisante.	Sendra et al., 2020 <sup>232</sup>
Qualitatif (imagerie)	PS	Fluorescence	-NH <sub>2</sub>	50 nm	Pas spécifié	Pas de purification	0,05 et 5 µg/mL	48 h	Pas de dépuración	MicroFluo	Accumulation dans le TD et adsorption sur les appendices.	Machado et al., 2021 <sup>233</sup>
Semi-quantitatif + Imagerie	PS	Fluorescence	-NH <sub>2</sub>	190 nm	Pas spécifié	Pas de purification	1 mg/L	1 h	Pas de dépuración	LPFluo MicroFluo	Accumulation dans le TD.	Kim et al., 2022 <sup>234</sup>

Abréviations : Cytomètre en flux (CMF), lecteur de plaques en fluorescence (MicroFluo), microscopie optique (MicroOpt), tube digestif (TD).

## II. Matériels et méthodes

### II. 1. Organismes d'étude

L'organisme modèle *Daphnia magna* provient de MicroBioTests Inc. (Daphtokit F™, Belgique). Les éphippies ont été mis en éclosion 72 h avant le jour de l'expérience d'exposition dans l'eau douce fourni (norme ISO 6341 ; NaHCO<sub>3</sub>: 64,75 mg/L; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 295 mg/L; MgCO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 123,25 mg/L; KCl: 5,75 mg/L) à 20-22°C et 6000 Lux.

Les artémias proviennent de Camargue, et ont été fournies par Camargue Pêche (Le Grau-du-Roi, France). Les organismes ont été placés au laboratoire, pendant minimum 48 h avant l'exposition, dans une eau de mer prélevée dans la mer Méditerranée, à 60 mètres de profondeur, près des laboratoires de l'environnement de l'IAEA (Monaco, Principauté de Monaco), puis filtrée à 1 µm et stérilisée par UV. La température de l'eau a été maintenue à 22,0 ± 0,5 °C. Sa salinité était de 39 ± 1 g/L et son pH de 8,03 ± 0,02. Un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h était de plus utilisé, avec une luminosité réglée à 30 µmol/m<sup>2</sup>/s. Les organismes étaient nourris une fois par jour par 4 L de phytoplancton (*Isochrysis galbana* ; 5.10<sup>4</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>) provenant de cultures maintenues aux laboratoires de l'environnement de l'IAEA (Monaco, Principauté de Monaco).

### II. 2. Nanoplastiques testés

Les daphnies ont été exposées à des nanoplastiques modèles NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%, sphériques et monodisperses, marqués au deutérium et synthétisés à l'aide de styrène deutéré (styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>) selon les conditions décrites dans le Chapitre 2, partie II. 2. 1. 1.

Les artémias ont été exposées à des nanoplastiques modèles NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, sphériques et monodisperses, marqués au carbone <sup>13</sup>C et synthétisés à l'aide de styrène marqué (styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>) selon les conditions décrites dans le Chapitre 2, partie II. 2. 1. 1.

### II. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de crustacés planctoniques

#### II. 3. 1. Etude n°1 : Accumulation et de la toxicité des nanoplastiques marqués au deutérium vis-à-vis de *Daphnia magna*

##### II. 3. 1. 1. Conditions d'exposition

Une fois éclos, les néonates de *D. magna* ont été nourris pendant 2 h avec 8-12 mg de la spiruline (Daphtokit F™, Belgique). Les études d'exposition ont alors été conduites dans des plaques multipuits en polycarbonate (24 puits par plaque). Chaque puits a été rempli par les milieux d'exposition (10 mL par puits) avant l'ajout des daphnies. Six milieux d'exposition différents ont été préparés : un sans nanoplastique, pour la condition témoin (eau douce de référence à composition similaire que milieu de culture, C<sub>0</sub>), et cinq milieux contaminés par les nanoplastiques modèles (NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%). Les cinq concentrations sont les suivantes : C<sub>1</sub> = 0,03 ppm ; C<sub>2</sub> = 0,4 ppm ; C<sub>3</sub> = 4,9 ppm ; C<sub>4</sub> = 12 ppm et C<sub>5</sub> = 36 ppm, et sont préparées dans l'eau douce de référence.

Tous les puits de même concentration en nanoplastiques ont été obtenus à partir d'une même solution mère. A noter que l'ajout de nanoplastiques ne modifie pas le pH des solutions (pH = 7,903 et 7,901, avant et après ajout des NP respectivement pour la solution la plus concentrée à T = 21,3 °C) et se situe dans la plage préconisée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), c'est-à-dire entre 6 et 9.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

Préalablement à l'exposition, les daphnies ont été transférées quelques minutes dans des puits « de rinçage » remplis par le milieu d'exposition. Les daphnies ont été exposées aux NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% pendant 48 h, en groupes de 5 par puits. Les analyses étant faites sur des lots de 15 individus, au total, 45 daphnies ont été exposées pour chaque condition, afin d'obtenir des triplicats après analyse. Des puits sans daphnies ont aussi été préparés pour évaluer le rôle des organismes dans les variations des concentrations en NP (cf. II. 3. 1. 2).

Après 48 h d'exposition, les daphnies mortes, ou immobilisées, ont été dénombrées. Le calcul de la mortalité a été fait selon les recommandations de l'OCDE, c'est à dire sur 20 daphnies par réplicats, avec dans notre cas, 4 réplicats pour le témoin et les concentrations à 0,02 et 11 ppm, et 6 réplicats pour les trois autres concentrations.<sup>205</sup>

Au terme de ces 48 h d'exposition et avant analyse, trois conditions de dépuration ont été testées :

- Condition 1 : pas de dépuration.
- Condition 2 : dépuration pendant 24 h dans l'eau douce de référence, sans nanoplastique et sans ajout d'algues.
- Condition 3 : dépuration pendant 24 h dans l'eau douce de référence, sans nanoplastique, avec ajout d'algues (ajout de 667 µL d'une dispersion de spiruline concentrée à 5 mg/mL par puits).

Les conditions 1 et 3 ont été testées pour toutes les concentrations d'exposition, tandis que la condition 2 n'a été mise en place qu'avec les concentrations de C<sub>2</sub> = 0,4 ppm, C<sub>3</sub> = 4,9 ppm et C<sub>5</sub> = 36 ppm. Les détails des conditions étudiées et des répartitions sur les plaques sont représentés dans l'Annexe 9.

Après dépuration, ou juste après l'exposition pour la condition 1, les daphnies ont été transférées quelques minutes dans de l'eau douce de référence non contaminée pour les rincer, puis elles ont été transférées par groupe de 15 dans les coupelles prévues pour la Py-GC/MS. Les coupelles ont ensuite été chauffées à 60°C, pendant 3 h, sur une plaque chauffante, afin de sécher les échantillons.

### II. 3. 1. 2. Quantification des nanoplastiques dans les milieux d'exposition

Afin de quantifier de potentielles variations au cours des expériences, des prélèvements du milieu d'exposition ont été faits, juste avant le transfert des daphnies (point t<sub>0</sub>), ainsi qu'après les 48 h d'exposition (point t<sub>48</sub>). Pour chaque réplicat, un volume de 30 µL a été prélevé et transféré directement dans une coupelle de pyrolyse en acier inoxydable avant d'être séché sur plaque chauffante, à 55 °C pendant 2 h. De la même façon, des prélèvements ont été faits (pour les concentrations de 0, 4,9 et 36 ppm, 4 réplicats par concentration) dans les puits laissés sans organisme, afin de déterminer l'adsorption des nanoplastiques sur les parois des puits en absence de daphnies.

### II. 3. 1. 3. Localisation des nanoplastiques par microscopie

La microscopie optique a été réalisée à l'aide d'un microscope DMLM (Leica®, Allemagne) équipé d'une caméra DFC280. Les images ont été prises avec l'objectif 5X ou 10X, en mode darkfield (réflexion) ou brightfield (transmission).

La microscopie de fluorescence a été réalisée avec un microscope inversé Zeiss Axio Observer.Z1 (Zeiss, Allemagne) avec une caméra CCD Zeiss Axiocam 506 ICc5, un objectif 20X et deux sets de filtres de fluorescence : le set de filtre Zeiss 15 (Excitation : 534-558 nm (BP)/ Emission : 590 nm



## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

(LP)), en rouge dans les images de microscopie, et le set de filtre Zeiss 63 HE (Excitation : 547-597 nm (BP)/ Emission : 567-691 nm (BP)), en violet dans les images de microscopie. Les échantillons ont été exposés pendant 4 ms pour BF, 800 ms pour le filtre 15 (rouge) et 1500 ms pour le filtre 63 HE (violet). Les traitements d'images ont été réalisés à l'aide du logiciel Image J/Fiji 1.46.<sup>235</sup>

### II. 3. 1. 4. Quantification des nanoplastiques dans les organismes

#### II. 3. 1. 4. 1. Quantification par Py-GC/MS

La méthode de quantification par Py-GC/MS a été décrite en détail dans le Chapitre 3, partie III. La détection des nanoplastiques marqués au deutérium a été faite en mode SIM, paramétré pour suivre le fragment spécifique  $m/z = 109$ .

Afin de quantifier les nanoplastiques, six calibrations identiques ont été préparées en transférant, dans les coupelles de pyrolyse, 30  $\mu\text{L}$  de solutions diluées des nanoplastiques modèles NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% (neuf concentrations différentes comprises entre 0,8 ppm et 100 ppm), et en les séchant sur une plaque chauffante, à 50°C, pendant 2h. On obtient donc des gammes de calibration linéaires entre 24 ng et 3  $\mu\text{g}$  de nanoplastiques. Les trois premières calibrations ont été analysées respectivement avant, pendant et après les échantillons de daphnies, et les trois autres calibrations ont servi de la même manière à quantifier les milieux d'exposition.

Les données d'accumulation ont été modélisées à l'aide d'une équation de Michaelis-Menten (cf. équation 4.1), à l'aide du logiciel OriginLab.<sup>236</sup>

$$m_c = m_{\max} \frac{C_{\text{moy}}}{K_M + C_{\text{moy}}} \quad 4.1$$

Avec :

- $m_c$  : masse de nanoplastiques accumulés par daphnie après 24 h d'exposition à la concentration  $c$  (en ng)
- $m_{\max}$  : capacité maximale du tube digestif des daphnies (en ng)
- $K_M$  : constante de Michaelis-Menten (en ppm)
- $C_{\text{moy}}$  : concentration moyenne d'exposition des nanoplastiques (en ppm)

#### II. 3. 1. 4. 2. Calcul des facteurs de bioconcentration

Des facteurs de bioconcentration (BCF) ont été calculés à partir des concentrations obtenues dans les daphnies, à l'aide de l'équation 3.5.

$$BCF = \frac{C_{\text{organisme}} (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{poids sec})}{C_{\text{milieu}} (\text{ppm})} \quad 4.2$$

Avec :

- BCF : le facteur de bioconcentration, sans unité
- $C_{\text{organisme}}$  : masse de nanoplastiques accumulés dans les daphnies (en mg/kg, poids sec)
- $C_{\text{milieu}}$  : concentration d'exposition des nanoplastiques (en ppm)

### II. 3. 2. Etude n°2 : Accumulation des nanoplastiques marqués au carbone $^{13}\text{C}$ par *Artemia sp.*

#### II. 3. 2. 1. Conditions d'exposition des artémias

Cinq séries ont été mises en place avec différentes conditions expérimentales, résumées dans le Tableau 4.3. Pour chaque série (1-5), toutes les conditions (chaque concentration en nanoplastiques

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia* sp. à l'aide du marquage isotopique

et chaque temps d'exposition) ont été réalisées en triplicats et une condition témoin a également été mise en place, dans les mêmes conditions, mais en absence de nanoplastiques (C<sub>0</sub>). Les milieux d'exposition de la condition témoin ont été préparés dans l'eau de mer de composition similaire au milieu de maintien en laboratoire des artémias. Pour toutes les expériences d'exposition, un même ratio de 1 organisme pour 2 mL a été gardé. Pour toutes les séries, les prélèvements des échantillons destinés à l'EA-IRMS ou la Py-GC/MS, consiste au prélèvement d'un organisme par réplicat, sauf mention contraire. Pour éliminer l'effet de genre lorsque celui-ci n'est pas au centre de l'étude, les séries (1-4) ont été réalisées exclusivement avec des mâles. Cet effet a en revanche été étudié dans la série 5, réalisée avec à la fois des mâles et des femelles.

**Tableau 4.3:** Résumé des conditions expérimentales des différentes séries l'étude n°2.

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
<b>Nombre d'organismes par réplicat</b>	10 mâles	10 mâles	10 mâles	50 mâles	5 mâles et 5 femelles
<b>Volume par réplicat (mL)</b>	20	20	20	100	20
<b>Durée d'exposition maximale</b>	24 h	24 h	48 h	24 h	24 h
<b>Prélèvements milieux (Py-GC/MS)</b>	0, 24 h	0, 24 h	0, 24 h, 48 h	-	-
<b>Prélèvements A.sp. (EA-IRMS)</b>	24 h	3 h, 6 h, 24 h	15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h	0, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 4 j	24 h
<b>Prélèvements A.sp. (Py-GC/MS)</b>	24 h	24 h	-	-	-
<b>Concentration des NP (ppm)</b>	0,001; 0,01; 0,1	0,4; 3; 7	0,7	0,5	1,6 ;4,0 ; 4,5

Les séries 1-3 ont été faites dans des conditions similaires, c'est-à-dire une exposition de 10 artémias par réplicat dans 20 mL pendant une durée maximale de 24 h, ou 48 h dans le cas de la série 3. Pour les séries 2 et 3, les flacons sans organisme ont aussi été préparés dans les mêmes conditions qu'en présence d'artémias, pour évaluer le rôle des organismes dans les variations des concentrations en NP (cf. III. 3. 2. ).

La série 1 vise à étudier l'accumulation à faible concentration. Les organismes ont été exposés à des concentrations en nanoplastiques C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> respectivement de 0, 0,001, 0,01 et 0,1 ppm. Des artémias ont été prélevées après 24 h d'exposition uniquement, à la fois pour les analyses EA-IRMS et celles par Py-GC/MS.

La série 2 étudie l'accumulation à plus forte concentration, ainsi que leur cinétique d'accumulation. Les artémias ont été exposées à des concentrations en nanoplastiques C<sub>0</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> respectivement de 0, 0,4 ppm, 3 ppm et 7 ppm. Trois temps de prélèvements (3 h, 6 h et 24 h) ont été mis en place pour les échantillons EA-IRMS, et seul celui à 24 h a été réalisé pour les échantillons de Py-GC/MS.

La série 3 complète la série 2 avec une étude de la cinétique d'accumulation plus détaillée. Les artémias ont été exposées à une concentration intermédiaire en nanoplastiques, C<sub>7</sub> de 0,7 ppm, pendant une durée maximale de 48 h. Six points de prélèvements ont été faits : 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h et 48 h, pour des analyses en EA-IRMS.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

La série 4 vise à mieux comprendre la dépuración des nanoplastiques en circuit ouvert chez *Artemia sp.* 50 artémias ont été tout d'abord exposées aux nanoplastiques pendant 24 h, dans 100 mL d'eau de mer contaminée à la concentration intermédiaire  $C_4$  (0,4 ppm). Un groupe témoin (à  $C_0$ ) de 15 artémias a aussi été mis en place dans 30 mL d'eau de mer. Après exposition, 9 artémias exposées aux nanoplastiques et 2 artémias non exposées (témoins) ont été prélevées pour caractériser le temps  $t_0$  de la dépuración (par EA-IRMS). Le reste des artémias vivantes ont été réparties, dans un aquarium de 20 L, en trois réplicats (11 par réplicats), en plus du groupe témoin (avec 13 artémias). Chaque réplicat est isolé dans l'aquarium à l'aide d'un tamis (seuil de coupure à 120  $\mu\text{m}$ ) permettant de créer des zones de dépuración indépendantes. Une alimentation d'eau de mer a été installée au-dessus de chaque tamis, pour assurer un renouvellement de l'eau homogène pour tous les groupes. Le débit des quatre entrées d'eau a été fixé à 5  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  pour un débit total de 20  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Les organismes ont été nourris une fois par jour, par l'ajout de 4 L de phytoplancton (*Isochrysis galbana* ;  $5\cdot 10^4$  cellules/mL). La circulation d'eau a été coupée pendant une heure, au moment de l'alimentation, pour éviter que la nourriture ne soit évacuée trop vite et pour permettre aux organismes de se nourrir. Les artémias ont été prélevées après différents temps de dépuración : 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 4 j, pour être analysées en EA-IRMS.

La série 5 vise à évaluer l'influence du genre (mâle ou femelle) des organismes sur l'accumulation. Cinq mâles et cinq femelles ont donc été sélectionnés et exposés ensemble, dans 20 mL d'eau de mer contaminée (à 1,6 ; 4,0 ; 4,5 ppm), pendant 24 h. Après l'exposition, pour chaque réplicat, 4 mâles et 4 femelles, encore vivants, ont été échantillonnés pour être analysés en EA-IRMS.

Pour toutes les séries, les artémias prélevées ont, tout d'abord, été transférées quelques minutes dans de l'eau de mer non contaminée, puis dans de l'eau déionisée propre, afin de les rincer. Les organismes ont ensuite été transférés dans des capsules en étain dédiées à l'IRMS, et des capsules en acier inoxydable désactivé pour les analyses Py-GC/MS. Toutes les capsules ont ensuite été séchées à 60°C pendant 3 h, sur plaque chauffante, puis fermées dans le cas des capsules EA-IRMS.

### II. 3. 2. 2. Quantification des nanoplastiques dans les milieux d'exposition

Afin de quantifier de potentielles variations au cours des expériences, des prélèvements du milieu d'exposition ont été faits, pour les séries 1-3, juste avant le transfert des artémias ( $t_0$ ), ainsi qu'à la fin de l'exposition ( $t_{24}$ ), en vue d'une analyse par Py-GC/MS. Etant donné que les concentrations d'exposition ( $C_1$ - $C_3$ ) sont trop basses pour pouvoir être détectées en Py-GC/MS, seules les concentrations supérieures à 0,1 ppm ont été considérées pour ces prélèvements ( $C_4$ - $C_7$ ). De la même façon, des prélèvements ont été faits dans les flacons laissés sans organisme, afin de déterminer l'adsorption des nanoplastiques sur les parois des flacons en absence d'artémias. Pour chaque réplicat, un volume de 30  $\mu\text{L}$  a été prélevé et transféré directement dans une coupelle de pyrolyse en acier inoxydable avant d'être séché sur plaque chauffante, à 55 °C pendant 2 h. Les échantillons ont ensuite été analysés par Py-GC/MS, dans les mêmes conditions que l'analyse des organismes.

### II. 3. 2. 3. Quantification des nanoplastiques dans les organismes

#### II. 3. 2. 3. 1. Quantification par EA-IRMS et analyseur élémentaire

Le développement de la méthode de quantification par EA-IRMS a été décrite en détail dans le Chapitre 3, partie IV., et rappelée dans la partie IV. 2. Pour résumer, cette méthode permet de remonter à la quantité de nanoplastiques présents dans les artémias à partir du  $\delta^{13}\text{C}$  des échantillons inconnus et de données connues sur les deux matrices séparées :  $\delta^{13}\text{C}$  et %C des artémias témoins, non exposés aux plastiques ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{MO}}$  et %C<sub>MO</sub>), et  $\delta^{13}\text{C}$  et %C des nanoplastiques marqués en carbone  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{NP}}$  et %C<sub>NP</sub>).

Les données caractérisant les artémias témoins, non exposés aux plastiques ont été obtenus expérimentalement par EA-IRMS et par analyse élémentaire, respectivement. Elles sont de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MO}} = -17,8 \pm 2,2 \text{ ‰}$  (n=15 mâles) et %C<sub>MO</sub> =  $40,1 \pm 0,5\%$ . %C<sub>NP</sub> a été estimé à partir des caractéristiques connues des NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, soit %C<sub>NP</sub> =  $88,56 \pm 0,05$ . La signature isotopique des NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%, trop enrichis pour être analysés directement par EA-IRMS, a été déduite de l'analyse de plusieurs mélanges de nanoplastiques marqués et non marqués comme décrit dans le Chapitre 3 ( $^{13}\text{C}_{\text{NPe}} = 71,1 \pm 0,2 \text{ ‰}$  ou  $\delta^{13}\text{C}_{\text{NPe}} = 217700 \pm 200 \text{ ‰}$ ).

#### II. 3. 2. 3. 2. Quantification par Py-GC/MS

La méthode de quantification par Py-GC/MS a été décrite en détail dans le Chapitre 3, partie III. La détection des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  a été faite en mode SIM, paramétré pour suivre le fragment spécifique m/z = 110.

Afin de quantifier les nanoplastiques, trois calibrations identiques ont été préparées en transférant, dans les coupelles de pyrolyse, 30  $\mu\text{L}$  de solutions diluées de nanoplastiques marqués, (neuf concentrations différentes comprises entre 1,6 ppm et 100 ppm), et en les séchant sur une plaque chauffante, à 50°C, pendant 2 h. On obtient donc des gammes de calibration comprenant entre 48 ng et 3  $\mu\text{g}$  de nanoplastiques. Les trois calibrations ont été analysées respectivement avant, pendant et après les échantillons d'artémias et des milieux d'exposition.

#### II. 3. 2. 3. 3. Calcul du facteur de bioconcentration

Des facteurs de bioconcentration (BCF) ont été calculés à partir des concentrations obtenues dans les artémias, après 24 h d'exposition (séries 1 et 2), à l'aide de l'équation 3.5, rappelée ci-dessous.

$$BCF = \frac{C_{\text{organisme}} (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{poids sec})}{C_{\text{milieu}} (\text{ppm})} \quad 3.5$$

Avec :

- BCF : le facteur de bioconcentration, sans unité
- C<sub>organisme</sub> : masse de nanoplastiques accumulés dans les artémias (en mg/kg, poids sec)
- C<sub>milieu</sub> : concentration d'exposition des nanoplastiques (en ppm)

#### II. 3. 2. 3. 4. Modèles de régressions utilisés pour les cinétiques

Différents modèles de régression non linéaires ont été appliqués sur les données à l'aide du logiciel Statistica 6. Les constantes des modèles ont été estimées par ajustement itératif. Pour les cinétiques d'accumulation, un modèle de type exponentiel avec saturation, décrit par l'équation 4.3 a été utilisé.

$$C_t = C_{\text{max}} * (1 - e^{-k_e t}) \text{ et } C_{\text{max}} = \frac{k_u}{k_e} \quad 4.3$$

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

Avec :

- $C_t$  : concentration massique de nanoplastiques par masse d'artémias ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
- $C_{\text{max}}$  : concentration maximale d'accumulation ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
- $k_u$  : constante de prise en charge ( $\text{heure}^{-1}$ )
- $k_e$  : constante d'élimination ( $\text{heure}^{-1}$ )
- $t$  : temps (heure)

Pour les cinétiques de dépuración, un modèle de type exponentiel à double composante, décrit par l'équation 4.4, a été utilisé, où les concentrations sont exprimées par rapport à la concentration au temps 0 ( $C^{\%}$ ).

$$C_t^{\%} = C_{0c}^{\%} * e^{-k_{ec}t} + C_{0l}^{\%} * e^{-k_{el}t} \quad 4.4$$

Avec :

- $C_t^{\%}$  : concentration résiduelle de nanoplastiques dans les artémias au temps  $t$ , par rapport au temps 0 (%)
- $C_{0c}^{\%}$  : concentration résiduelle de nanoplastiques à résidence courte dans les artémias au temps 0 (%)
- $C_{0l}^{\%}$  : concentration résiduelle de nanoplastiques à résidence longue dans les artémias au temps 0 (%)
- $k_{ec}$  : constante d'élimination des composants à durée de résidence courte ( $\text{heure}^{-1}$ )
- $k_{el}$  : constante d'élimination des composants à durée de résidence longue ( $\text{heure}^{-1}$ )
- $t$  : temps (heure)

Les temps de demi-vie des deux composantes à durée de résidence courte ou longue  $T_{b\%c}$  ou  $T_{b\%l}$  ont été déterminés par l'équation 4.5.

$$T_{b\%i} = \frac{\ln 2}{k_{ei}} \quad 4.5$$

Avec :

- $T_{b\%i}$  : Temps de vie biologique de la composante  $i$
- $k_{ei}$  : constante d'élimination de la composante  $i$  ( $\text{heure}^{-1}$ )

## II. 4. Instruments et protocoles d'analyse

### II. 4. 1. Analyses par Py-GC/MS

Les échantillons du milieu d'exposition et de daphnies exposées aux NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% et artémias exposées aux NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% ont été analysés à l'aide d'un pyrolyseur Frontier Lab 3030D (Frontier Lab, Japon), équipé de l'auto-Shot Sampler AS-1020E (Frontier Lab, Japon), directement couplé à un GC/MS. Deux appareils différents ont été utilisés. Le développement de méthode a été fait majoritairement à l'aide d'un GC/MS Agilent 5977B (Agilent Technologies). Les droites d'étalonnage et le calcul des LD ont été fait à l'aide d'un pyrolyseur 3030D (Frontier Lab, Japon) couplé à un GC/MS Shimadzu QP2010 SE (Shimadzu, Japon). Les échantillons ont été placés dans des coupelles en acier inoxydable désactivé (Eco-Cup LF, 80  $\mu\text{L}$ , Frontier Lab, Saikon, Japon) et séchés de toute eau résiduelle avant analyse.

Tous les paramètres techniques utilisés ont été présentés dans l'Annexe 1. Brièvement, les échantillons ont été pyrolysés à 500°C pendant 1 min, suivi d'une injection en mode *split* (1 : 50). Les pyrolysats ont été séparés à l'aide d'une colonne apolaire (DB5-HT, 30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia* sp. à l'aide du marquage isotopique

Technologies). La température du four a été programmée à 50°C pendant 2,5 min, augmentée jusqu'à 320°C, avec une rampe de 10°C.min<sup>-1</sup>, puis stabilisée à 320°C pendant 4 min. La détection des nanoplastiques a été faite en mode SIM en suivant la masse du fragment spécifique aux nanoplastiques utilisés, soit le fragment  $m/z = 109$  pour les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (étude n°1), et  $m/z = 110$  pour les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% (étude n°2).

### II. 4. 2. Analyses par EA-IRMS et analyseur élémentaire

Les analyses isotopiques et élémentaires ont été faites au sein de l'Institut des sciences analytiques (ISA, Villeurbanne, France).

Les signatures isotopiques en carbone des échantillons ont été obtenues à l'aide d'un analyseur élémentaire Flash HT couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique IRMS Delta V Plus, via l'interface ConFlo IV (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Les échantillons ont été placés dans des nacelles d'étain (étain léger, 5 x 9 mm, IVA Analysentechnik, Meerbusch, Allemagne), et ont été brûlés dans une unité de combustion maintenue à 900°C, avant injection via un flux d'hélium additionné d'oxygène. Les analyses isotopiques <sup>13</sup>C ont été effectuées à l'aide des signaux collectés sur les masses 44, 45 et 46 de l'IRMS. Des matériaux de référence certifiés, ainsi que des matériaux de référence internes (pour les enrichissements très hauts en <sup>13</sup>C) ont été utilisés pour vérifier la justesse et la précision des résultats. La liste et les caractéristiques de ces matériaux sont présentées en Annexe 2.

Les analyses de carbone total (%C) ont été effectuées sur un analyseur carbone/hydrogène (ISA, CNRS France). Les échantillons ont été pesés (environ 1 mg) et placés dans des capsules d'argent (Lüdi 3.2X6 mm). Ils ont été brûlés dans une unité de combustion verticale comprenant un four supérieur porté à 1050 °C et un four inférieur à 850 °C, garni d'oxyde de cuivre et alimenté par un flux de 95 ml/min en O<sub>2</sub>. Le carbone de l'échantillon, transformé en dioxyde de carbone, a été mesuré sur un détecteur infrarouge Rosemount NGA 2000. L'étalonnage a été effectué à l'aide de matériaux de référence certifiés, présentés en Annexe 2.

### II. 4. 3. Analyses par microscopie

La microscopie optique a été réalisée à l'aide d'un microscope DMLM (Leica®, Allemagne) équipé d'une caméra DFC280. Les images ont été prises avec l'objectif 5X ou 10X, en mode darkfield (réflexion) ou brightfield (transmission).

La microscopie de fluorescence a été réalisée avec un microscope inversé Zeiss Axio Observer.Z1 (Zeiss, Allemagne) avec une caméra CCD Zeiss Axiocam 506 ICc5, un objectif 20X et deux sets de filtres de fluorescence : le set de filtre Zeiss 15 [Excitation : 534-558 nm (BP)/ Emission : 590 nm (LP)], en rouge dans les images de microscopie, et le set de filtre Zeiss 63 HE [Excitation : 547-597 nm (BP)/ Emission : 567-691 nm (BP)], en violet dans les images de microscopie. Sauf mention contraire, les échantillons ont été exposés pendant 4 ms pour BF, 800 ms pour le filtre 15 (rouge) et 1500 ms pour le filtre 63 HE (violet). Les traitements d'images ont été réalisés à l'aide du logiciel Image J/Fiji 1.46.<sup>235</sup>

### III. Etude n°1 : Accumulation et toxicité des nanoplastiques marqués au deutérium vis-à-vis de *Daphnia magna*

#### III. 1. Description des nanoplastiques utilisés : NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%

Les daphnies ont été exposées à des nanoplastiques modèles marqués au deutérium NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%. Ces nanoplastiques ont été synthétisés à partir de 82% de styrène deutéré (styrène-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>) et 18% d'acide acrylique, selon les conditions décrites dans le Chapitre 2, partie II. 2. 1. 1. Les nanoplastiques ont été synthétisés avec de l'acide acrylique afin d'apporter en surface des groupements carboxyles qui ont deux fonctions, stabiliser les particules sans avoir recours à des tensioactifs et imiter l'oxydation de surface des débris plastiques vieillis dans l'environnement. Les images de microscopie des NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% ont été regroupées dans la Figure 4.5. Leurs propriétés, caractérisées dans le Chapitre 2, sont brièvement rappelées dans le Tableau 4.4.

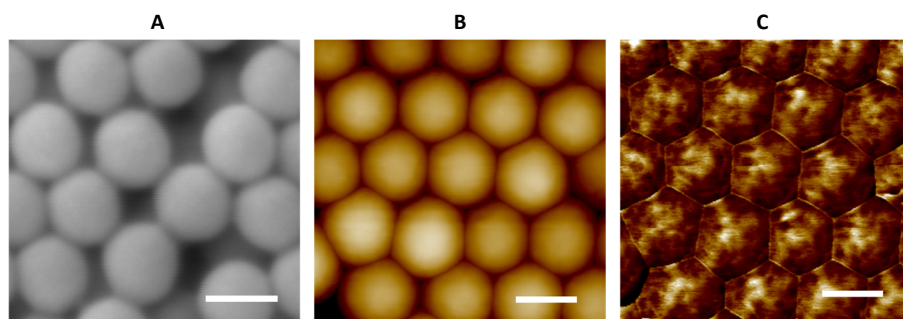


Figure 4.5: Image MEB (A) et images AFM des NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%, en hauteur (B) et en adhésion (C). Barre d'échelle à 100 nm.

Tableau 4.4: Propriétés des nanoplastiques NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100%.

Echantillon	Diamètre (nm) <sup>a</sup>	PDI <sup>a</sup>	Potentiel zêta ζ (mV) <sup>b</sup>	[COOH] surface <sup>c</sup>	
				(mmol/g)	(/nm <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>
NP-( <sup>2</sup> H) <sub>5</sub> -100%	129 ± 1	0,04 ± 0,02	-51 ± 2	640 ± 4	8,7 ± 0,1

<sup>a</sup>obtenus par DLS ; <sup>b</sup>[NP]=10 ppm dans tampon PBS à 1 mM, pH = 7 ; <sup>c</sup>protocole adapté de Hennig et al.<sup>159</sup>  
<sup>d</sup>estimé pour des particules lisses

La Figure 4.5 montre que les NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% sont sphériques et monodisperses (confirmé par le PDI dans le Tableau 4.4), avec une surface légèrement irrégulière, ce qui est en adéquation avec les densités de groupements carboxyles titrés à la surface des nanoplastiques, qui ne sont pas très élevées. La forme des nanoplastiques modèles et leur monodispersité permet d'avoir des comportements physico-chimiques similaires pour l'ensemble des particules et d'accéder à la fois à leur concentration en masse et celle en nombre. Dans la suite de l'étude, les concentrations seront exprimées en concentration massique (ppm). Le nombre de particules peut être obtenu à partir de la masse de nanoplastiques (en mg) à l'aide de l'équation 4.6, en considérant leur masse volumique comme égale à celle du PS et du PAA : ρ=1,05 g.cm<sup>-3</sup>. Avec un diamètre de 129 nm, on obtient le facteur de conversion de 8,47.10<sup>11</sup>. Ce facteur peut aussi être utilisé pour obtenir la concentration en nombre (#/L), à partir des concentrations en masse (en ppm).

$$N_{NP} = \frac{10^{-3} \times m_{NP} \text{ (en mg)}}{\rho \times \frac{4}{3} \pi \times \left(\frac{D * 10^{-7}}{2}\right)^3} \quad 4.6$$

Avec :

- $N_{NP}$  : nombre de nanoplastiques
- $m_{NP}$  : masse de nanoplastiques (mg)
- $\rho$  : masse volumique ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
- $D$  : diamètre des nanoplastiques (nm)

La stabilité des nanoplastiques a été testée dans les conditions d'utilisation de l'étude, c'est-à-dire dans l'eau douce de référence, préparée selon la norme ISO 6341. Une solution de nanoplastiques a été préparée dans ce milieu, à une concentration supérieure à la concentration maximale utilisée pendant l'étude (50 ppm), et la taille des nanoplastiques a été suivie pendant 7 jours par DLS. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.6 et montrent que les nanoplastiques sont stables et qu'il n'y a pas d'agrégation significative pendant les 7 jours.

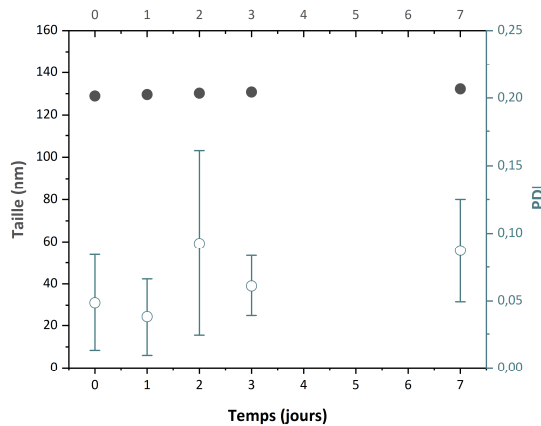


Figure 4.6: Suivi de la taille (● - axe à gauche) et polydispersité (○ - axe à droite) des nanoplastiques deutérés pendant 7 jours pour une concentration de 50 ppm dans l'eau douce de référence (norme ISO 634). Mesures effectuées à température ambiante.

### III. 2. Résumé du développement analytique au Py-GC/MS

Lors du développement de la méthode analytique, détaillé dans le Chapitre 3, partie III., il a été démontré qu'il était possible de quantifier les nanoplastiques marqués au deutérium NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% dans la matrice organique complexe *Daphnia magna*. En effet, le marquage à l'isotopie permet de quantifier les nanoplastiques de polystyrène grâce au fragment spécifique et quantifiable  $m/z = 109$ , correspondant au styrène marqué, fragment qui n'est pas produit de manière significative par la matrice, contrairement au fragment styrène du polystyrène non marqué. Après avoir identifié ce fragment spécifique et optimisé les paramètres de pyrolyse, des calibrations linéaires et répétables ont pu être mises en place. Les limites de détection instrumentale et de méthode (prenant en compte la matrice) ont été calculées à 4,0 et à 7,4 ng, respectivement, et la limite de quantification à 18,3 ng. Enfin, l'absence d'effets de matrice, que ce soit venant des matrices organiques ou d'éventuels sels ajoutés dans le milieu a été vérifiée. La méthode ainsi développée a donc pu être



**CHAPITRE 4.** Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

utilisée dans l'étude présentée en partie III. 3. pour quantifier, à l'aide du Py-GC/MS, l'accumulation des NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% dans les daphnies et dans leur milieu d'exposition.

**III. 3. Accumulation et toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de *Daphnia magna***

*III. 3. 1. Stratégie de l'étude*

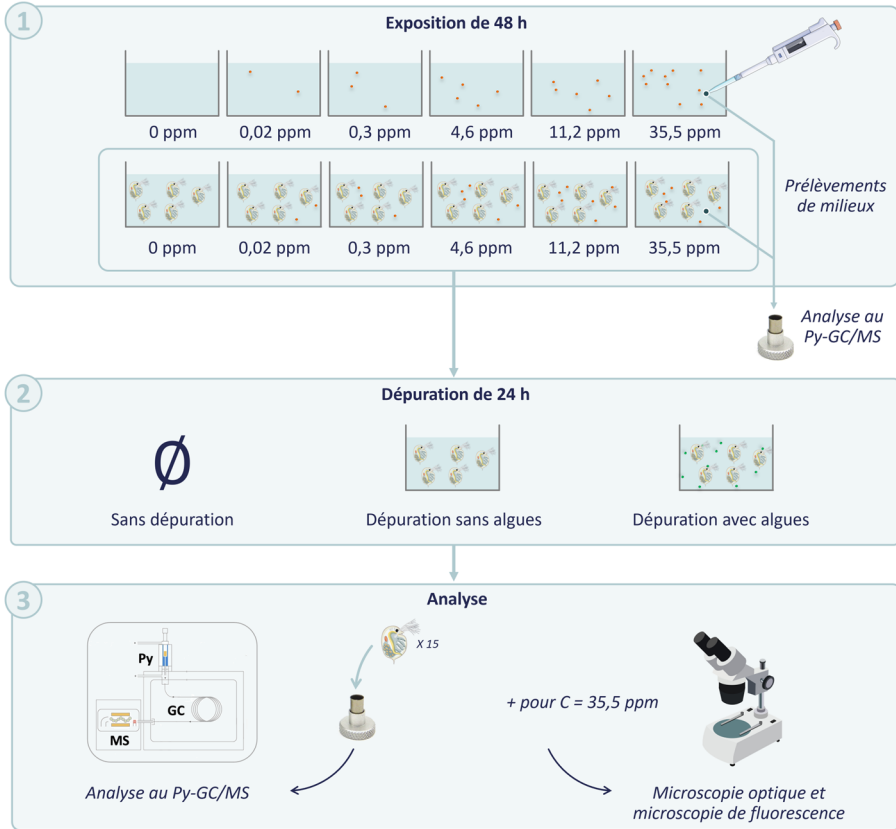
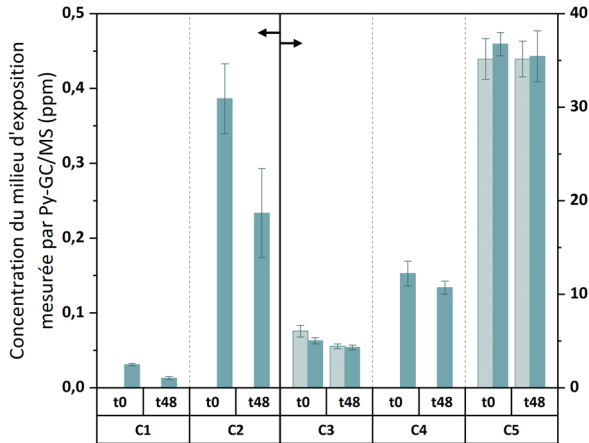


Figure 4.7: Schéma présentant la stratégie de l'étude n°1.

III. 3. 2. Quantification des nanoplastiques dans les milieux d'exposition

Des prélèvements ont été faits dans les milieux d'exposition, au début et à la fin des expositions, afin de quantifier de potentielles variations au cours des expériences, en présence mais aussi en absence de daphnies. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.8.



**Figure 4.8:** Concentrations des milieux d'exposition mesurées par Py-GC/MS ( $C_1$  et  $C_2$  : échelle de gauche ;  $C_3$ - $C_5$  : échelle de droite) en fonction du temps de prélèvement (0 ou 48 h après le début de l'exposition), pour les milieux en absence (bleu clair) pour  $C_3$  et  $C_5$  seulement, ou en présence des daphnies (bleu foncé). Avec :  $C_1 = 0,030$  ppm ;  $C_2 = 0,38$  ppm ;  $C_3 = 4,9$  ppm ;  $C_4 = 12$  ppm et  $C_5 = 36$  ppm.

En ce qui concerne les puits sans daphnies (seulement pour les concentrations  $C_3 = 4,9$  ppm et  $C_5 = 36$  ppm, en bleu clair sur la Figure 4.8), on observe une diminution de la concentration du milieu d'exposition de 27% entre le début et la fin de l'expérimentation pour  $C_3$ . Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette baisse de concentration avec le temps. L'hypothèse de la sédimentation, causée par une agrégation des nanoplastiques peut être écartée puisque l'absence d'agrégation des nanoplastiques, dans l'eau douce de référence utilisée avec les daphnies, a été vérifiée par DLS préalablement à l'expérience. L'autre hypothèse possible est que les nanoplastiques se soient adsorbés sur les parois des puits, constitués de polycarbonate, ce qui ferait diminuer la concentration en solution. Des phénomènes d'adsorption sur du polycarbonate ont en effet déjà été observés par Albignac et al. qui ont étudié la rétention de nanoplastiques sur différents types de filtres. Des taux de rétention de 30% ont été obtenus pour des nanoplastiques de polystyrène fonctionnalisés par des groupements carboxyles, lors de la filtration sur des filtres en polycarbonate ayant un seuil de coupure de  $0,4 \mu\text{m}$ .<sup>237</sup> Ces résultats sont en adéquation avec la diminution de la concentration des nanoplastiques observés dans les puits sans daphnies.

En présence des organismes (en bleu foncé sur la Figure 4.8), la constatation est la même : une diminution de la concentration entre le début et la fin de l'expérimentation est observée pour toutes les concentrations étudiées, d'autant plus forte que la concentration initiale est faible. Par exemple, pour les concentrations initiales 0,031, 4,9 et 36 ppm ( $C_1$ ,  $C_3$  et  $C_5$ ), on observe une diminution sur les 48 h de, respectivement, 59%, 14% et 3% (concentrations de 0,013, 4,3 et 35 ppm après 48 h). Ces diminutions n'étant pas significativement plus fortes qu'en absence de daphnies, on peut estimer qu'elles sont en majorité dues aux phénomènes d'adsorption.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

La concentration d'exposition n'étant pas constante tout au long de l'expérience, nous avons calculé une concentration moyenne d'exposition selon les recommandations de l'OCDE<sup>206</sup> (cf. équation 4.7), qui pose l'hypothèse d'une décroissance exponentielle de la concentration entre les points initiaux et finaux. On obtient les concentrations d'exposition présentées dans le Tableau 4.5, concentrations qui seront utilisées dans la suite de ces travaux.

$$C_{moy} = \frac{C_i - C_f}{\ln(C_i) - \ln(C_f)} \quad 4.7$$

Avec :

- $C_{moy}$  : concentration moyenne d'exposition des nanoplastiques (en ppm)
- $C_i$  : concentration d'exposition initiale des nanoplastiques (en ppm)
- $C_f$  : concentration d'exposition finale des nanoplastiques (en ppm)

**Tableau 4.5:** Concentrations moyennes d'exposition des daphnies.

Nom	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
C <sub>i</sub>	0,030 ± 0,001	0,38 ± 0,05	4,9 ± 0,3	12 ± 1	36 ± 1
C <sub>f</sub>	0,013 ± 0,002	0,23 ± 0,06	4,3 ± 0,3	10,7 ± 0,7	35 ± 3
<b>Concentration moyenne C<sub>moy</sub> (ppm)</b>	0,020 ± 0,001	0,30 ± 0,04	4,6 ± 0,1	11,2 ± 0,3	35,5 ± 0,8

### III. 3. 3. Toxicité aigüe à 48 h d'exposition

La toxicité aigüe des nanoplastiques sur *Daphnia magna* a été estimée à l'aide d'un test d'immobilisation à court terme (48 h dans notre cas), effectué selon les recommandations de l'OCDE.<sup>205</sup> Les pourcentages d'individus immobilisés ont été reportés dans le Tableau 4.6, ci-dessous, et le détail du nombre d'individus immobilisés pour chaque groupe de traitement a été reporté dans l'Annexe 10.

**Tableau 4.6:** Nombre d'individus immobilisés en pourcentage.

Nom	C <sub>0 moy</sub> <sup>a</sup>	C <sub>1 moy</sub> <sup>a</sup>	C <sub>2 moy</sub> <sup>b</sup>	C <sub>3 moy</sub> <sup>b</sup>	C <sub>4 moy</sub> <sup>a</sup>	C <sub>5 moy</sub> <sup>b</sup>
<b>Concentration moyenne (ppm)</b>	0	0,020 ± 0,001	0,30 ± 0,04	4,6 ± 0,1	11,2 ± 0,3	35,5 ± 0,8
<b>Pourcentage d'immobilisation (%)</b>	3 ± 3 %	0 ± 0 %	2 ± 2 %	3 ± 4 %	4 ± 2 %	3 ± 3 %

<sup>a</sup>n=4 replicats ; <sup>b</sup>n=6 replicats

Sur toute la gamme de concentration, y compris aux concentrations les plus fortes, aucune mortalité, ou immobilisation, significative n'a été observée puisque le pourcentage d'immobilisation n'excède pas 10%. Nos résultats montrent peu ou pas de toxicité létale aigüe des NP utilisés sur les daphnies dans la gamme de concentrations 0,02-35,5ppm.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats à ceux de la littérature, les publications portant sur l'écotoxicité de nanoplastiques de polystyrène par rapport à *Daphnia magna* ayant fait l'objet d'une review en 2023.<sup>217</sup> Kokalj *et al.* y ont recensé 38 publications portant sur le sujet, et ont établi des critères de qualité, basés sur l'exhaustivité des informations les plus importantes. Seules 18% des publications ont été considérées comme suffisamment complètes pour être utilisées lors de l'évaluation globale de la toxicité des NP. Parmi les aspects les moins reportés, on trouve la

composition des additifs et la fonctionnalisation des particules, détaillées dans seulement 36% et 41% des publications, respectivement. Sur les 7 publications validées, 6 d'entre-elles ont étudié la toxicité au travers d'observations telles que la mortalité ou la reproduction.<sup>88,238-242</sup> C'est le cas de Heinlaan *et al.*, qui ont observé de la mortalité avant purification par dialyse des NP, mais n'en ont plus observé après purification, de manière similaire à l'étude de Pikuda *et al.*<sup>87,88</sup> Dans les cinq autres publications, la présence d'additifs est indiquée, mais soit les auteurs estiment que les niveaux sont en dessous des niveaux de toxicité pour les daphnies,<sup>238</sup> soit ils indiquent que les dispersions ont été purifiées avant d'étudier leur toxicité sans plus de précision. Parmi ces publications, Frankel *et al.* n'ont pas reporté de mortalité pour les NP de 200 et 500 nm, mais en ont observé pour les NP de 50 nm.<sup>240</sup> Verdú *et al.* ont obtenu une  $EC_{50}$  de  $32 \pm 2$  mg/L pour les NP de 30 nm de diamètre.<sup>242</sup> En comparaison, Wu *et al.* ont observé plus de 70% de mortalité au bout de 48 h, pour des nanoplastiques de diamètres compris entre 100 et 300 nm.<sup>239</sup> Il est difficile de conclure sur la toxicité des nanoplastiques avec si peu de publications, cependant, la purification des NP en diminuant la teneur en additifs semble abaisser voire annuler la toxicité des NP. Notre étude menée sur des NP synthétisés en absence de tensioactif ni autre additifs et purifiés par cycles de centrifugation/redispersion, sont ainsi en accord avec des publications utilisant des NP de taille similaire.<sup>217,240</sup>

### III. 3. 4. Accumulation et dépuración des nanoplastiques

#### III. 3. 4. 1. Quantification par Py-GC/MS

Les quantités de nanoplastiques accumulés par les daphnies ont été quantifiées par Py-GC/MS pour différentes concentrations d'exposition, mais aussi différentes conditions de dépuración. Les résultats sont présentés en ng de nanoplastiques par daphnie dans la Figure 4.9 et dans le Tableau 4.8, et en mg de nanoplastiques par g de daphnie (masse sèche) dans l'Annexe 11.

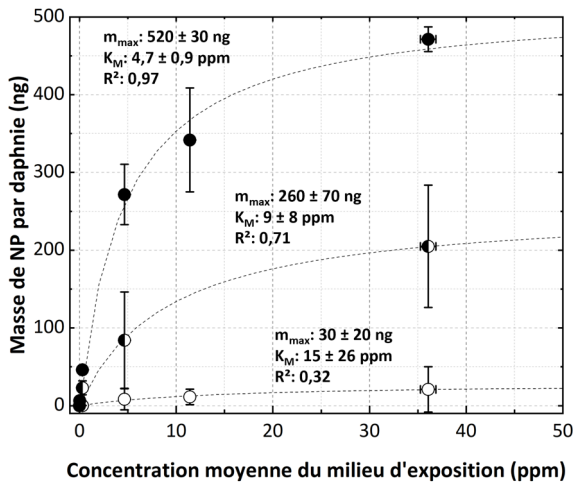


Figure 4.9: Masse de nanoplastiques deutérés accumulés par les daphnies (en ng par daphnie) après 48 h d'exposition, en fonction de la concentration moyenne en NP dans le milieu d'exposition (d'eau douce de référence, norme ISO 6341), et en fonction des conditions de dépuración : (●) pas de dépuración, (◐) dépuración en milieu sans NP et sans algues, (○) dépuración en milieu sans NP avec algues. Ajustement selon le modèle de Michaelis-Menten, décrit par l'équation 4.1, pour chaque condition de dépuración (---).

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

Pour une même condition de dépuraction, la quantité accumulée augmente avec la concentration d'exposition, avec une tendance à un plateau aux concentrations les plus élevées. La hauteur de ce plateau, c'est-à-dire la capacité maximale d'accumulation d'une daphnie, a été estimée à l'aide d'une équation de Michaelis-Menten, pour chaque condition de dépuraction. Pour les daphnies non dépurées, une masse de nanoplastiques maximale de 520 ng est obtenue par daphnie, tandis qu'après dépuraction, cette masse est réduite à 260 ng en absence d'algues et 30 ng en présence d'algues, soit une diminution de 49% et 94 %, respectivement.

La tendance décrite par les valeurs d'accumulation maximale est cohérente avec les quantités de nanoplastiques accumulés par les organismes, pour les différentes concentrations d'exposition : la plus grande quantité de nanoplastiques accumulés est mesurée dans les daphnies n'ayant pas eu de phase de dépuraction, une diminution est observée après une dépuraction simple, sans ajout de nourriture, mais la diminution la plus forte est observée pour la dépuraction en présence de nourriture.

Ces résultats semblent montrer que la quantité de nanoplastiques accumulés par les daphnies dépend beaucoup de l'ajout ou non d'une phase de dépuraction après l'exposition, et des conditions dans laquelle cette dépuraction est faite. En respectant une dépuraction avec ou sans présence de nourriture, la quantité accumulée de NP dans les organismes décroît significativement, ce qui semble indiquer que les nanoplastiques accumulés sont en grande partie localisés dans le système digestif des daphnies.

### III. 3. 4. 2. Imagerie par microscopie

#### III. 3. 4. 2. 1. Microscopie optique

Les daphnies exposées à la concentration maximale de nanoplastiques (35,5 ppm) ont été observées, après dépuraction, par microscopie optique afin de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de dépuraction de *Daphnia magna* vis-à-vis des nanoplastiques. Les images sont présentées dans la Figure 4.10. En microscopie optique, après exposition, les nanoplastiques qui « brillent » ont été observés en mode darkfield et apparaissent très foncés en mode brightfield. Les algues, quant à elles, ont une coloration verte et apparaissent avec moins de contraste. Indépendamment des conditions d'exposition, la microscopie ne nous permet pas de distinguer des nanoplastiques ailleurs que dans le tube digestif des daphnies, ce qui confirme l'accumulation préférentielle des débris plastiques dans le tube digestif.

Les images peuvent néanmoins être séparées selon les conditions de dépuraction : Sans dépuraction (Figure 4.10-B) et avec dépuraction sans algues (Figure 4.10-C), l'accumulation de nanoplastiques dans les daphnies s'observe très distinctement. En revanche, lorsque les daphnies sont soumises à une dépuraction avec algues (Figure 4.10-D), ce sont des éléments de coloration verte, et peu contrastés, qui sont observés dans le tube digestif. Une image similaire est obtenue pour des daphnies témoins seulement exposées à un milieu contenant des algues sans NP (Figure 4.10-A).

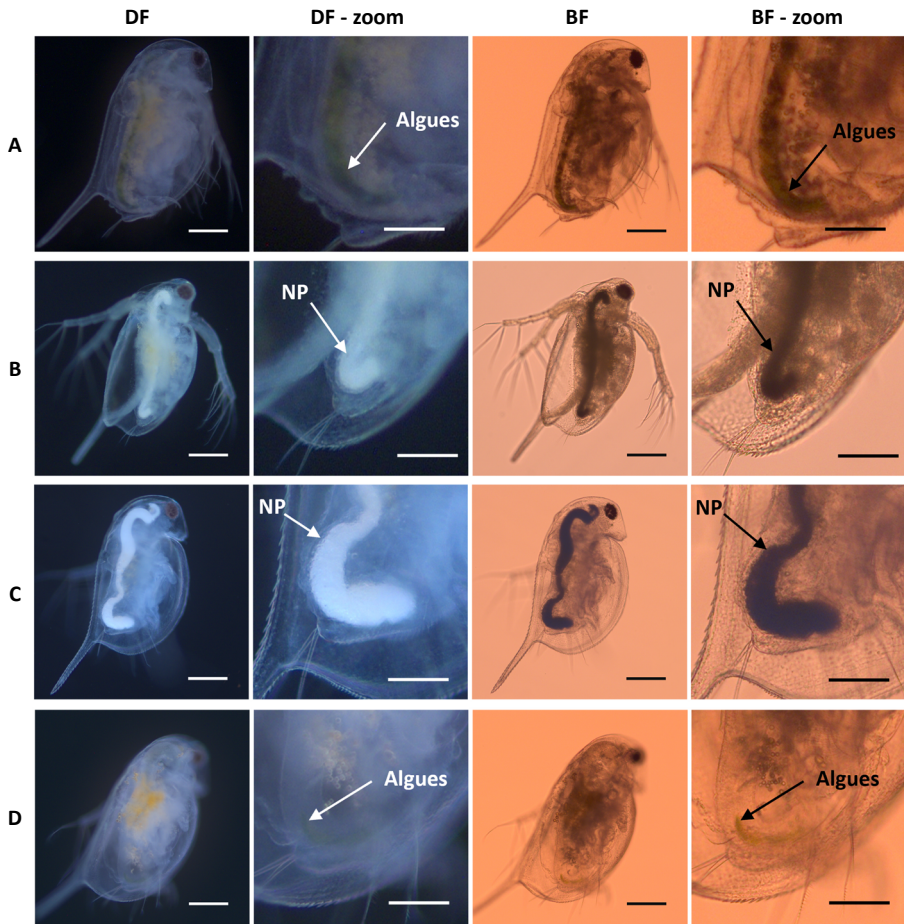


Figure 4.10: Images de microscopie optique en mode darkfield et brightfield (DF et BF, échelle = 200 µm), et leur zoom (DF-zoom et BF-zoom, échelle = 100 µm) de *Daphnia magna* après 24 h d'exposition à 0 ppm (Témoin- A) ou 36 ppm de NP-(2H)5-100% (B - D) ou selon les conditions de dépuración suivantes : pas de dépuración (B), dépuración sans algues (C), dépuración avec algues (A et D). Images complémentaires en Annexe 4.

### III. 3. 4. 2. 2. Microscopie de fluorescence

Les daphnies exposées à la concentration maximale de nanoplastiques (35,5 ppm) ont également été observées, après dépuración, par microscopie de fluorescence, ainsi que les nanoplastiques seuls et les algues seules. Les algues fluorescent très bien avec les deux filtres, les nanoplastiques en revanche, qu'ils aient été analysés en dispersion très concentrée, ou séchée, montrent peu ou pas de fluorescence à part liée à des effets de bords.

En ce qui concerne les daphnies, de la fluorescence au niveau du tube digestif est observée pour toutes les conditions d'exposition, avec deux tendances. Pour la condition témoin, avec apport d'algues, et pour la condition 3 (dépuración avec algues), la fluorescence apparaît plus hétérogène que les deux autres conditions, et la fluorescence apparaît aussi un peu plus forte pour le filtre

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

pas-long (rouge) que le filtre passe-bande (violet) alors qu'aucune différence n'est observée pour les conditions sans dépuraton et dépuraton sans algues. Ces résultats, comparés à ceux des analyses des NP et des algues seules, ne sont pas cohérents, ce qui pourrait être expliqué par des interférences avec certains composés présents dans les organismes ou encore des différences dans les conditions des échantillons (pH, agrégats...) qui peuvent avoir une influence sur les phénomènes de fluorescence.<sup>222,243</sup>

Les analyses microscopie de fluorescence ne nous ont donc pas permis de poser des conclusions claires, quant à la présence d'algues ou de nanoplastiques dans les daphnies et auraient nécessité des tests supplémentaires, notamment avec d'autres filtres de fluorescence.

### III. 3. 5. Discussion de l'étude n°1

Les analyses par microscopie (Figure 4.10) et de quantification par Py-GC/MS (Figure 4.9) montrent que les conditions de dépuraton ont une forte influence sur la présence et la quantité de nanoplastiques retrouvés dans les daphnies. La microscopie révèle que les nanoplastiques sont majoritairement accumulés au niveau du tube digestif, ce qui indique qu'ils ont été ingérés par les organismes.

Les résultats de Py-GC/MS montrent que l'accumulation des nanoplastiques est dépendante de la concentration d'exposition. Les valeurs obtenues avant dépuraton, en ng de nanoplastiques par daphnie, sont rappelées dans Tableau 4.8 (Condition 1) et sont présentées en mg de nanoplastiques par gramme de daphnie (masse sèche) dans l'Annexe 11. Entre 6,5 et 471 ng de nanoplastiques (soit entre  $6 \cdot 10^6$  et  $4 \cdot 10^8$  particules, cf. équation 4.6) ont été retrouvés par daphnie selon la concentration d'exposition. Ces quantités sont dans les mêmes ordres de grandeur que les résultats obtenus dans d'autres travaux tels que ceux de Rist *et al.*<sup>220</sup> qui ont trouvé une accumulation maximale de 170 ng/daphnie après exposition pendant 24 h à 1 mg/L de nanoplastiques de 100 nm de diamètre, ou encore ceux de Tamayo-Belda *et al.*<sup>138</sup> qui ont détecté entre 100 à 160 ng/daphnie après exposition pendant 48 h à 6 mg/L de nanoplastiques de 286 nm de diamètre. Si l'on compare en termes de nombre de particules, dans le cas de Rist *et al.*<sup>220</sup> les ordres de grandeur restent comparables avec nos résultats ( $5 \cdot 10^7$  particules/daphnies), mais ce n'est pas le cas de Tamayo-Belda *et al.*<sup>138</sup> qui indiquent un nombre de particules bien inférieur (entre 7800 et 12500 particules/ daphnie).

Dans la partie III. 3. 2. , une diminution de la concentration des milieux d'exposition en présence et en absence de daphnies a été observée et attribuée à une adsorption sur les parois des puits. A partir des masses de nanoplastiques accumulées par daphnies, nous avons calculé le pourcentage que représente cette accumulation comparée à la variation de masse de nanoplastiques se trouvant dans le milieu d'exposition, par puits. Les résultats, présentés dans le Tableau 4.7, montrent que les nanoplastiques accumulés par les organismes ne représentent pas plus de 20% de la variation totale observée dans le milieu. Ces observations interrogent quant à la fiabilité des méthodes indirectes de quantification de l'accumulation de nanoplastiques dans des organismes consistant à l'analyse du milieu d'exposition.<sup>232,234</sup>

**CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique**

**Tableau 4.7:** Bilan de masse des nanoplastiques par puits : différence de masse de nanoplastiques dans le milieu d'exposition entre  $t_0$  et  $t_{48}$  (en  $\mu\text{g}/\text{puits}$ ), masse de nanoplastiques accumulés par les daphnies avant dépuración (en  $\mu\text{g}/\text{puits}$ ) et pourcentage des nanoplastiques accumulés par rapport à la différence de masse de nanoplastiques totale.

Nom	C <sub>1</sub> moy	C <sub>2</sub> moy	C <sub>3</sub> moy	C <sub>4</sub> moy	C <sub>5</sub> moy
Concentration moyenne d'exposition (ppm)	0,02	0,3	4,6	11,2	35,5
Masse de nanoplastiques à $t_0$ ( $\mu\text{g}/\text{puits}$ )	0,3	3,8	49,5	120,1	361,7
Différence de masse de nanoplastiques dans le milieu d'exposition entre $t_0$ et $t_{48}$ (en $\mu\text{g}$ par puits)	0,2	1,5	7,0	14,9	12,7
Masse de nanoplastiques accumulés par les daphnies avant dépuración (en $\mu\text{g}$ par puits)	0,032	0,231	1,358	1,709	2,357
Pourcentage des nanoplastiques accumulés par rapport à différence de masse de nanoplastiques dans le milieu d'exposition entre $t_0$ et $t_{48}$	18%	15%	19%	11%	19%

Les facteurs de bioconcentration, qui traduisent la capacité des organismes à concentrer le polluant auquel ils sont exposés, ont pu être calculés à partir de la concentration de nanoplastiques accumulés dans les organismes, et de la concentration du milieu d'exposition (cf. équation 3.5). Les résultats reportés dans le Tableau 4.8 montrent que plus la concentration d'exposition est faible, plus le BCF est élevé. Plusieurs réglementations internationales et européennes utilisent le facteur de bioconcentration pour l'évaluation des risques de potentiels polluants, telles que Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (OSPAR de l'anglais *Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic*), la réglementation TSCA (de l'anglais Toxic Substance Control Act) de l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) ou encore la réglementation européenne REACH (de l'anglais *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*). En générale la substance est considérée comme bioaccumulable si la valeur de BCF dépasse un certain seuil, compris entre 500 et 5000, suivant les réglementations. Par exemple, la convention OSPAR estime que les composés possèdent un réel risque lié à la bioaccumulation à partir d'un BCF de 500, alors le seuil est à 1000 pour la réglementation TSCA et 2000 pour la réglementation européenne REACH.<sup>244</sup> La convention OSPAR et la réglementation TSCA classeraient ainsi les nanoplastiques comme bioaccumulables. Le seuil de la réglementation REACH, quant à lui, est dépassé avec les analyses obtenues par Py-GC/MS pour les concentrations inférieures à 12 ppm. Pour les concentrations inférieures à 5 ppm, toutes les réglementations considèrent que les nanoplastiques sont bioaccumulables.

Il doit cependant être mentionné que ces conclusions doivent être à nuancer. Tout d'abord, les facteurs de bioconcentration ont été mis en place pour les composés lipophiles et sont connus pour être limités pour décrire l'accumulation des composés inorganiques (les métaux par exemple). Le BCF assume une exposition par l'eau, comme menée dans notre expérience. Pourtant, le tube digestif est l'organe principal dans lequel se retrouvent les NP. Ces dernières sont donc plutôt considérées comme de la nourriture par les daphnies, faussant l'utilisation du BCF. De plus, nos conditions expérimentales ne reflètent pas entièrement les conditions environnementales. Par exemple, l'exposition a été faite sans présence de nourriture. Or, il a été montré que la présence de



## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

nourriture lors de cette phase d'exposition pouvait faire baisser l'accumulation jusqu'à plus de 80%.<sup>227</sup> Les valeurs de bioaccumulation très hautes que nous avons obtenues mettent tout de même en lumière, le risque que représentent les nanoplastiques pour les consommateurs primaires que sont les daphnies et secondaires, par transfert trophique.

**Tableau 4.8:** Masse de nanoplastiques deutérés quantifiés par Py-GC/MS (en ng par daphnie, résultats en mg/g en Annexe 11) pour les différentes conditions de dépuraton, pourcentage de diminution après dépuraton et facteur de bioconcentration (BCF) correspondant, en fonction de la concentration moyenne du milieu d'exposition, pour la condition sans dépuraton.

Nom	Concentration d'exposition (ppm)	Condition 1 : Pas de dépuraton		Condition 2 : Dépuraton sans algues		Condition 3 : Dépuraton avec algues	
		(ng/daphnie)	Facteur de bioconcentration	(ng/daphnie)	Diminution après dépuraton*	(ng/daphnie)	Diminution après dépuraton*
<b>C<sub>0</sub></b>	<b>0,00</b>	0 ± 0	-	-	-	0 ± 0	0
<b>C<sub>1 moy</sub></b>	<b>0,02</b>	6,5 ± 0,54	43000 ± 5000	-	-	0,1 ± 0,12	98,5 %
<b>C<sub>2 moy</sub></b>	<b>0,3</b>	46 ± 3	21000 ± 1000	23 ± 9	50,2 %	0,13 ± 0,03	99,7 %
<b>C<sub>3 moy</sub></b>	<b>4,6</b>	270 ± 40	8100 ± 700	80 ± 60	69,0 %	8 ± 14	96,9 %
<b>C<sub>4 moy</sub></b>	<b>11,2</b>	340 ± 70	4000 ± 1000	-	-	10 ± 10	96,7 %
<b>C<sub>5 moy</sub></b>	<b>35,5</b>	470 ± 20	1600 ± 100	200 ± 80	56,5 %	20 ± 30	95,5 %

\*Valeurs calculées à l'aide des valeurs en ng/daphnie.

En ce qui concerne les conditions de dépuraton, si les images de microscopie montrent la présence de NP après une dépuraton sans nourriture (Figure 4.10-B), les analyses quantitatives permettent de mesurer qu'une dépuraton a lieu : entre 50% et 69% de diminution sont observés (cf. Tableau 4.8). La dépuraton est cependant bien plus importante en présence de nourriture (algues) : entre 95,5 et 99,7% de diminution, après dépuraton. Ces résultats sont en accord avec d'autres études de la littérature, notamment celles de Rist *et al.*<sup>220</sup> et Wang et Wang<sup>222,227</sup>, qui ont étudié l'ingestion et la dépuraton de micro- et nanoplastiques par *Daphnia magna* (cf. CHAPITRE 4. Partie I. 2. et Tableau 4.1). Dans la première étude, les auteurs ont observé, pour des nanoplastiques de 100 nm, une diminution de 29% lors de la dépuraton sans algues, contre 93% en présence d'algues. Wang et Wang ont quant à eux observé une diminution d'environ 10% en absence d'algues et environ 70% en présence d'algues (NP de 200 nm). Des résultats similaires ont été aussi observés dans des travaux portant sur d'autres types de contaminants tels que pour des sédiments contaminés en métaux,<sup>245</sup> pour des nanotubes de carbone,<sup>246,247</sup> ou encore pour des nanoparticules d'or.<sup>248</sup> Tous mettent en évidence une dépuraton plus importante en présence de nourriture. Malgré ces résultats concordants, la revue bibliographique a montré que seule une minorité des équipes qui ont étudié l'exposition aux NP, ont inclus l'addition de nourriture lors de l'étape de dépuraton (cf. Tableau 4.1).<sup>220,222,225</sup> Nos résultats confirment pourtant qu'avec les daphnies, cet aspect est nécessaire puisque pour cette espèce, la pression exercée par l'entrée de nouvelle nourriture a un rôle important dans l'excrétion du contenu du tube digestif.<sup>201</sup>

Après 24 h de dépuraton, même en présence de nourriture, des nanoplastiques dans les daphnies sont toujours détectés. Si les niveaux sont en dessous des limites de détection pour les concentrations d'exposition inférieures à 1 ppm, pour les autres concentrations, les quantités résiduelles dans les daphnies sont significatives. Cependant, les valeurs sont à considérer avec précaution. En effet, la dépuraton a été faite en milieu fermé sans renouvellement d'eau, il est donc possible qu'une partie des nanoplastiques excrétés aient été réingérés pendant la durée de cette phase de dépuraton, soit par ingestion directe, soit *via* l'adsorption sur les algues présentes dans le

milieu. On ne peut donc pas dire avec certitude si une partie des nanoplastiques a été assimilée ou pas. Pour appréhender si une assimilation par translocation des nanoplastiques au-delà des barrières cellulaires était possible, on peut s'appuyer sur les travaux de Hansen et Peters qui ont étudié la perméabilité des membranes péritrophiques à l'aide de fractions de dextrane à différentes masses moléculaires, et de particules de latex de différentes tailles.<sup>74,249</sup> Ils ont observé que la membrane péritrophique des daphnies était perméable à des particules de 130 nm de diamètre mais pas à celles de 327 nm. Les nanoplastiques modèles NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% utilisés dans nos travaux ont un diamètre de 129 ± 1 nm (cf. Tableau 4.4), il est donc envisageable qu'il y ait eu de la translocation des NP assimilés au cours de notre étude. Cette étape ne faisait pas partie de nos objectifs d'étude mais l'hypothèse pourrait être confirmée dans le futur par des analyses complémentaires telles que de l'imagerie à plus haute résolution.

### III. 4. Bilan de l'étude

Au travers de cette étude, les nanoplastiques modèles marqués au sein de la chaîne macromoléculaire par des atomes de deutérium, ont montré tout leur potentiel pour les études d'écotoxicité en milieu complexe grâce à leur suivi quantitatif par Py-GC/MS au sein des crustacés planctoniques *Daphnia magna*. Malgré le nombre abondant d'études concernant les daphnies, peu sont celles qui sont allées jusqu'à la quantification de la bioaccumulation des nanoplastiques dans ces organismes. C'est ce qui a été fait ici, et pour la première fois, à notre connaissance, avec des nanoplastiques modèles marqués au deutérium.

Les daphnies ont été exposées pendant 48 h à différentes concentrations de nanoplastiques (entre 20 ppb à 35,5 ppm). La mortalité des daphnies reste non significative sur toute la gamme de concentration. Les organismes ont ensuite été observés par microscopie optique qui révèle que les NP sont essentiellement présents dans le tube digestif des daphnies. La quantification par Py-GC/MS des nanoplastiques dans les daphnies après exposition montre que la quantité accumulée par les organismes dépend de la dose d'exposition, avec une tendance à un plateau, pour les plus fortes concentrations. Les facteurs de bioconcentration obtenus sont élevés (entre 1 600 et 43 000) et d'autant plus forts que la concentration d'exposition est faible, ce qui met en lumière le risque que représentent les nanoplastiques pour le reste de la chaîne alimentaire, via un potentiel transfert trophique.

Par ailleurs, l'analyse des milieux d'exposition au début et à la fin de l'expérience a permis de mettre en évidence de l'adsorption des nanoplastiques sur les parois des puits d'exposition, qui engendre une diminution importante de la concentration en nanoplastiques dans le milieu et qui n'est pas liée à l'accumulation des NP par les daphnies (qui représente moins de 6% de cette diminution). Ces observations interrogent quant à la fiabilité des méthodes indirectes de quantification de l'accumulation de nanoplastiques dans des organismes consistant à l'analyse du milieu d'exposition.<sup>232,234</sup>

Enfin, la quantification des NP selon plusieurs conditions de dépuration a montré l'importance de l'apport de nourriture pour la dépuration des daphnies avec une dépuration d'environ 50 % en absence de nourriture, et supérieure à 95% en présence d'algues. Par ailleurs, de tels taux de dépuration révèlent que les nanoplastiques ingérés ne sont pas ou peu assimilés. Des analyses complémentaires telles que de l'imagerie à haute résolution, ou des tests de transfert trophique, seraient intéressantes pour prouver une éventuelle translocation des nanoplastiques et pour mieux rendre compte des phénomènes d'accumulation à l'échelle d'un écosystème.

#### IV. Etude n°2 : Accumulation des nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C par *Artemia sp.*

##### IV. 1. Description des nanoplastiques modèles utilisés : NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%

Les nanoplastiques modèles utilisés pour cette étude sont marqués au carbone <sup>13</sup>C : NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%. Ils ont été synthétisés à l'aide de 82% de styrène marqué (styrène-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>) et 18% d'acide acrylique, selon les conditions décrites dans le Chapitre 2, partie II. 2. 1. 1. Comme pour les nanoplastiques deutérés, les nanoplastiques ont été synthétisés avec de l'acide acrylique afin d'apporter en surface des groupements carboxyles qui ont deux fonctions, stabiliser les particules sans avoir recours à des tensioactifs et imiter l'oxydation de surface des débris plastiques vieillis dans l'environnement. Les images de microscopie des NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% ont été regroupées dans la Figure 4.11. Leurs propriétés, caractérisées dans le Chapitre 2, sont brièvement rappelées dans le Tableau 4.9.

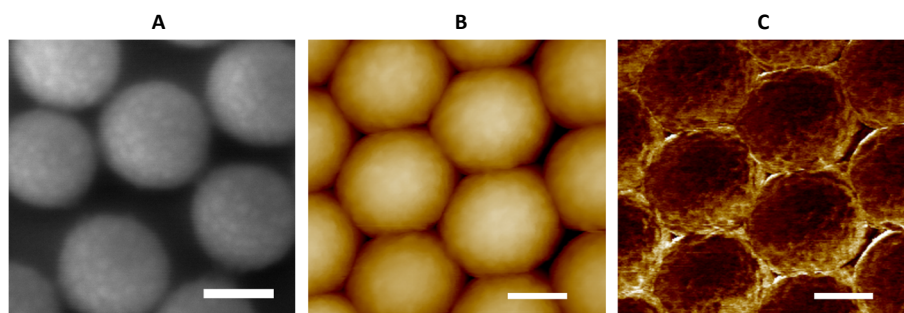


Figure 4.11: Image MEB (A) et images AFM des NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% en hauteur (B) et en adhésion (C). Barre d'échelle à 100 nm.

Tableau 4.9: Propriétés des nanoplastiques NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%

Echantillon	Diamètre (nm) <sup>a</sup>	PDI <sup>a</sup>	Potentiel zéta ζ (mV) <sup>b</sup>	[COOH] surface <sup>c</sup>	
				(mmol/g)	(/nm <sup>2</sup> )
NP-( <sup>13</sup> C) <sub>6</sub> -100%	214 ± 2	0,02 ± 0,02	-43 ± 3	590 ± 20	13,4 ± 0,5

<sup>a</sup>obtenus par DLS ; <sup>b</sup>[NP]=10 ppm dans tampon PBS à 1 mM, pH = 7 ; <sup>c</sup>protocole adapté de Hennig et al. <sup>159</sup>

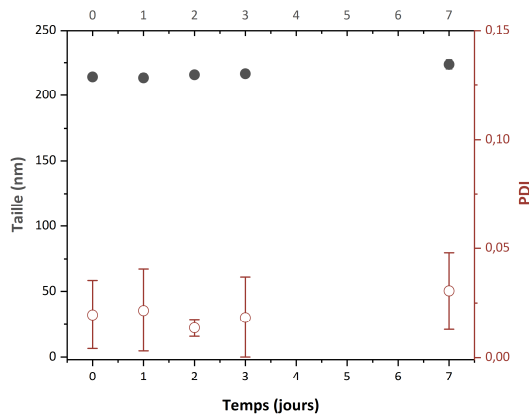
La Figure 4.11 montre que les NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% sont sphériques et monodisperses (confirmé par le PDI dans le Tableau 4.9), avec une surface rugueuse et une morphologie de type framboise, ce qui est en adéquation avec les densités de groupements carboxyles titrés à la surface des nanoplastiques, qui sont assez élevées. La forme des nanoplastiques modèles et leur monodispersité permet d'avoir des comportements physico-chimiques similaires pour l'ensemble des particules et d'accéder à la fois à leur concentration en masse et celle en nombre. Dans la suite de l'étude, les concentrations seront exprimées en concentration massique (ppm). Le nombre de particules peut être obtenu à partir de la masse de nanoplastiques (en mg) à l'aide de l'équation 4.6, en considérant leur masse volumique comme égale à celle du PS et du PAA :  $\rho=1,05 \text{ g.cm}^{-3}$ . Avec un diamètre de 214 nm, on obtient le facteur de conversion de  $1,86.10^{11}$ . Ce facteur peut aussi être utilisé pour obtenir la concentration en nombre (#/L), à partir des concentrations en masse (en ppm).

$$N_{NP} = \frac{10^{-3} \times m_{NP} \text{ (en mg)}}{\rho \times \frac{4}{3} \pi \times \left(\frac{D * 10^{-7}}{2}\right)^3} \quad 4.6$$

Avec :

- $N_{NP}$  : nombre de nanoplastiques
- $m_{NP}$  : masse de nanoplastiques (mg)
- $\rho$  : masse volumique ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
- $D$  : diamètre des nanoplastiques (nm)

La stabilité des nanoparticules a été testée dans les conditions d'utilisation de l'étude, c'est-à-dire dans de l'eau de mer (prélevée dans la mer Méditerranée, filtrée à  $1 \mu\text{m}$  et stérilisée par UV). Une solution de nanoplastiques a été préparée dans ce milieu à une concentration supérieure à la concentration maximale étudiée pendant l'étude (50 ppm), et la taille des particules a été suivie pendant 7 jours par DLS. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.12. Ils montrent une très légère augmentation de la taille après 7 jours sans variation significative de la polydispersité ( $\text{PDI} < 0.05$ ), mais pas d'agrégation significative dans l'eau de mer après 48 h qui est la durée d'exposition maximale.



**Figure 4.12:** Suivi par DLS de la taille (● - axe à gauche) et de la polydispersité (○ - axe à droite) des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  pendant 7 jours pour une concentration de 50 ppm dans l'eau de mer. Mesures effectuées à température ambiante.

#### IV. 2. Résumé du développement analytique à l'EA-IRMS

Dans le Chapitre 3, partie IV., une méthode analytique a été développée pour quantifier, en EA-IRMS, des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%) dans des matrices organiques complexes, en particulier dans les *Artemia sp.*

Une étude a d'abord été faite de manière théorique et a montré qu'une telle quantification était possible pour des nanoplastiques marqués à l'isotopie, à condition de connaître les signatures isotopiques des nanoplastiques, et de la matrice, individuellement, ainsi que leur pourcentage de carbone respectif. Les données caractérisant les artémias témoins, non exposées aux plastiques ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{MO}}$  et  $\%C_{\text{MO}}$ ) ont été obtenues expérimentalement par EA-IRMS et par analyse élémentaire, respectivement. Les valeurs sont  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MO}} = -17,8 \pm 2,2 \text{ ‰}$  ( $n=15$  éch mâles) et  $\%C_{\text{MO}} = 40,1 \pm 0,5\%$ .  $\%C_{\text{NP}}$  a été estimé à partir des caractéristiques connues des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, soit  $\%C_{\text{NP}} = 88,56 \pm 0,05$ . La signature isotopique des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%, trop enrichis pour être analysés directement par EA-IRMS, a été déduite de l'analyse de plusieurs mélanges de nanoplastiques marqués et non marqués ( $^{13}\text{C}_{\text{NPe}} = 71,1 \pm 0,2 \text{ ‰}$  ou  $\delta^{13}\text{C}_{\text{NPe}} = 217700 \pm 200 \text{ ‰}$ ) suivant une méthodologie décrite dans le chapitre 3.

Les nanoplastiques NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% ont ensuite été quantifiés dans les différentes matrices, dont des *Artemia sp.* broyées, avec une bonne justesse pour les fractions supérieures à la limite de détection, i.e. 0,002mg/g pour les artémias broyées. Dans le Chapitre 3 partie IV. 5. 3., l'analyse d'artémias non broyées a permis la détermination d'une limite de détection de méthode, correspondant aux conditions réelles d'analyses, calculée à 0,050 mg/g de nanoplastiques (0,167 mg/g pour la limite de quantification).

La méthode ainsi développée sera donc utilisée dans l'étude présentée en partie IV. 3. pour quantifier, à l'aide de l'EA-IRMS, l'accumulation des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% dans les artémias, combinée avec des analyses par Py-GC/MS pour comparer les deux méthodes et quantifier les nanoplastiques dans le milieu d'exposition.

### IV. 3. Accumulation des nanoplastiques par *Artemia sp.*

#### IV. 3. 1. Stratégie de l'étude

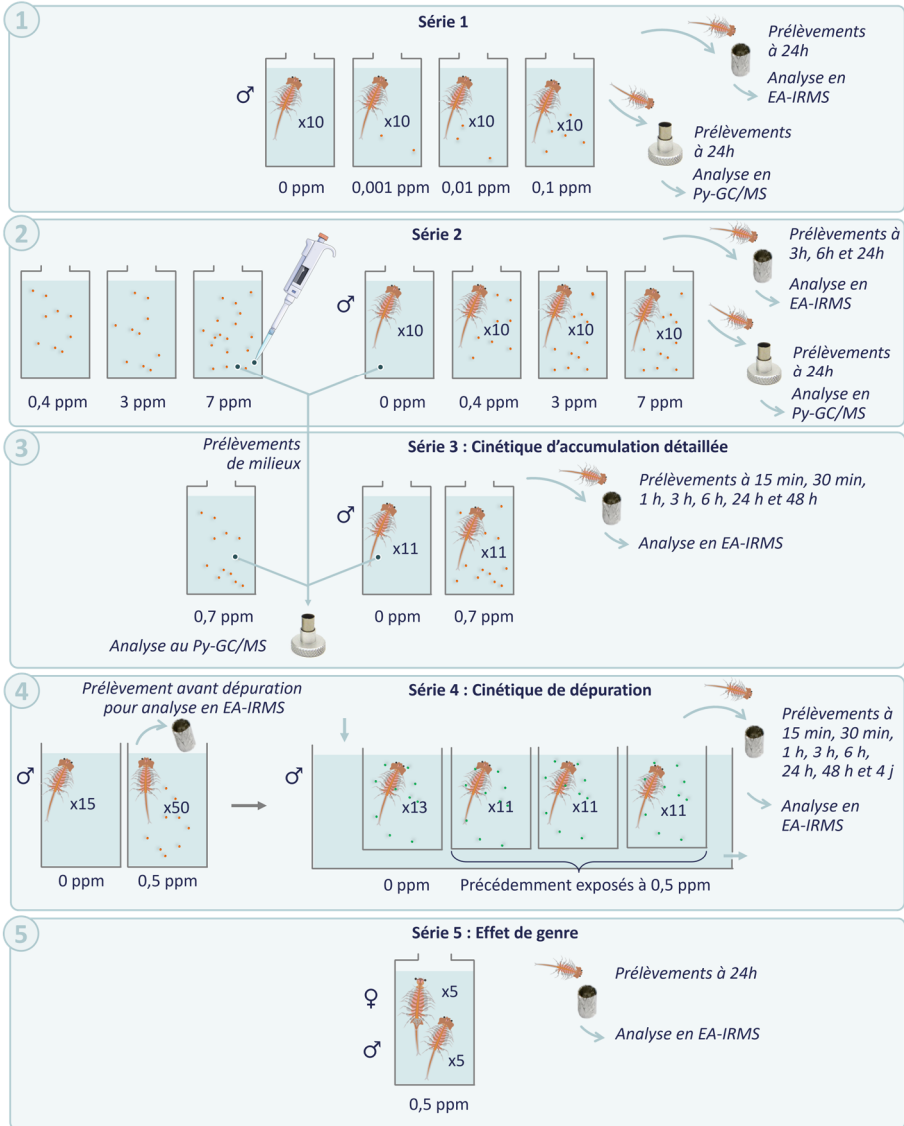


Figure 4.13: Schéma présentant la stratégie de l'étude n°2.

IV. 3. 2. Quantification des nanoplastiques dans les milieux d'exposition

Lors de cette étude, les artémias ont été exposées à différentes concentrations de nanoplastiques : Trois concentrations inférieures ou égales à 0,1 ppm et quatre concentrations supérieures à 0,1 ppm. Pour les trois concentrations les plus basses, trop basses pour être détectables en Py-GC/MS, seules les concentrations nominales ont été prises en compte.

Pour les concentrations supérieures à 0,1 ppm, des prélèvements ont été faits dans les milieux d'exposition, au début et à la fin des expositions, afin de quantifier de potentielles variations ayant lieu au cours des expériences, en présence mais aussi en absence d'artémias. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.14, en rouge foncé pour les milieux avec organismes et en rouge clair, pour les prélèvements dans les flacons sans organisme.

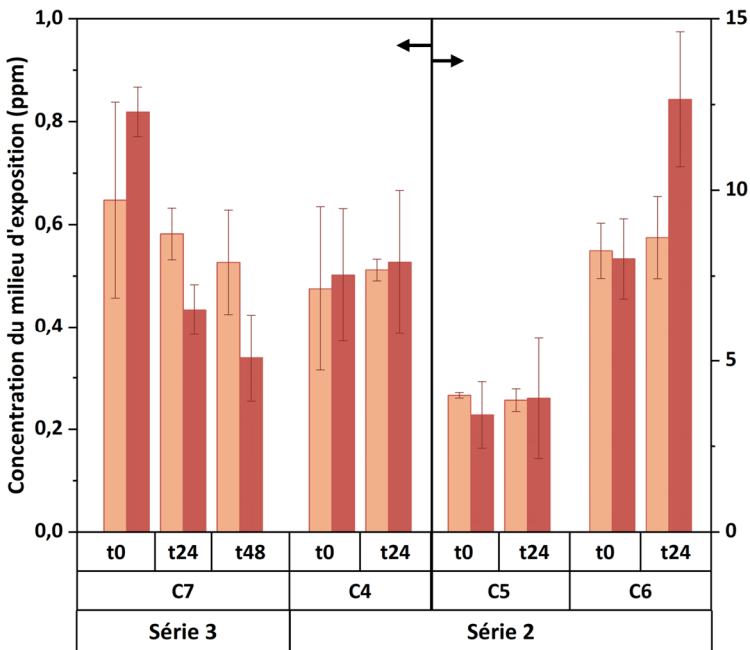


Figure 4.14: Concentration des milieux d'exposition des artémias, mesurées par Py-GC/MS (C<sub>7</sub> de la série 3 et C<sub>4</sub> de la série 2 : échelle de gauche ; C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> : échelle de droite), en fonction du temps de prélèvement (0, 24 h ou 48 h après le début de l'exposition), pour les milieux en absence (rouge clair) ou en présence d'artémias (rouge foncé). Avec : C<sub>4</sub> = 0,4 ppm, C<sub>5</sub> = 3 ppm, C<sub>6</sub> = 7 ppm et C<sub>7</sub> = 0,7 ppm.

Dans la série 2, les artémias ont été exposées à C<sub>4</sub> = 0,4 ppm ; C<sub>5</sub> = 3,0 ppm et C<sub>6</sub> = 7 ppm (10 artémias pour 20 mL de milieu, par réplicat, avec trois points de prélèvements). Pour les trois concentrations, les analyses des milieux sans artémias ne montrent pas de variation significative entre les concentrations à t<sub>0</sub> et t<sub>24</sub>. De la même façon, pour les concentrations C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub>, aucune variation significative de la concentration des milieux en présence d'artémias n'est observée. En revanche, pour la concentration C<sub>6</sub>, une augmentation de plus de 58% (de 7 à 11 ppm) est observée après 24 h, uniquement en présence d'artémias. Une explication qui pourrait justifier d'une concentration plus forte serait de l'évaporation, ce qui est peu probable, d'autant plus parce que l'on ne retrouve

**CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia* sp. à l'aide du marquage isotopique**

pas ce phénomène dans les autres conditions, y compris à la même concentration mais en absence d'artémias. Nous avons donc considéré ce point comme une anomalie.

Dans la série 3, les artémias ont été exposées à  $C_7 = 0,7$  ppm (10 artémias pour 20 mL de milieu, par réplicat, avec 7 points de prélèvements). Les conditions d'exposition sont donc similaires à la concentration  $C_4 = 0,4$  ppm de la série 2, avec cependant, une différence de nombre de prélèvements d'artémias, et donc de nombre d'artémias dans le milieu pendant l'expérience (malgré un nombre identique à  $t_0$ ). En ce qui concerne la série 3, on observe une diminution de la concentration avec le temps, forte en présence d'artémias (-47% après 24 h et -59% après 48 h ; de 0,7 à 0,4 et 0,3 ppm respectivement) et faible en leur absence. La différence entre les résultats des séries 2 et 3 pourrait être expliquée par des différences d'adsorption. Cependant, ceci est peu probable dans notre cas, car les flacons utilisés étaient exactement du même type, ainsi que les volumes de solutions initiaux. En revanche, la différence pourrait être due au nombre d'artémias en solution. Les organismes étant significativement plus nombreux dans la série 2, et ont pu, plus efficacement, homogénéiser la solution et éviter tout phénomène d'adsorption, contrairement à la série 3. En effet, les artémias, lorsqu'elles nagent, produisent un courant, qui dans notre cas peut homogénéiser la solution.<sup>250</sup> Nous avons testé ce phénomène en mettant 10 organismes, dans 20 mL d'eau de mer, en triplicats, dans les flacons utilisés pour la suite des expérimentations, et ajoutant par-dessus une goutte de colorant. Le colorant, resté à la surface au début de l'expérience, a été homogénéisé dans toute la solution, par les artémias, en moins d'une heure (données non montrées).

Si l'on exclut la concentration finale  $C_6$  de la série 2, qui est considérée comme une anomalie, la série 3 est la seule série à observer des variations de concentration avec le temps, expliqué par des phénomènes d'adsorption, comme observée dans l'étude avec les daphnies (cf. partie II. 3. 1. 2).

Afin de prendre en compte les variations de concentration, nous avons calculé une concentration moyenne d'exposition selon les recommandations de l'OCDE<sup>206</sup> (cf. Equation 4.7, rappelée ci-dessous), qui pose l'hypothèse d'une décroissance exponentielle de la concentration entre les points initiaux et finaux. Pour la série 2, les variations n'étant pas significatives, seules les concentrations initiales ont été prises en compte. On obtient les concentrations d'exposition présentées dans le Tableau 4.10.

$$C_{moy} = \frac{C_i - C_f}{\text{Ln}(C_i) - \text{Ln}(C_f)} \quad 4.7$$

Avec :

- $C_{moy}$  : concentration moyenne d'exposition des nanoplastiques (en ppm)
- $C_i$  : concentration d'exposition initiale des nanoplastiques (en ppm)
- $C_f$  : concentration d'exposition finale des nanoplastiques (en ppm)

**Tableau 4.10:** Concentrations moyennes d'exposition des artémias.

Série	1			2			3
	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$C_5$	$C_6$	$C_7$
Type de concentration	Nominale	Nominale	Nominale	$C_i$	$C_i$	$C_i$	Moyenne
$C_i$	0,001	0,01	0,1	$0,4 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,9$	$7 \pm 1$	$0,72 \pm 0,04$
$C_f$	-	-	-	$0,5 \pm 0,1$	$3 \pm 2$	$11 \pm 2$	$0,3 \pm 0,07$
Concentration moyenne (ppm)	0,001	0,01	0,1	$0,4 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,9$	$7 \pm 1$	$0,47 \pm 0,04$



IV. 3. 3. Mortalité des artémias

Durant toutes nos expérimentations, et pour chaque temps de prélèvement, le nombre d'individus morts a été recensé, et ces individus ont été retirés du milieu pour éviter tout effet de toxicité dû à leur dégradation. Des données de mortalité ont pu être calculées et sont reportées dans la Figure 4.15, et en détail dans l'Annexe 15.

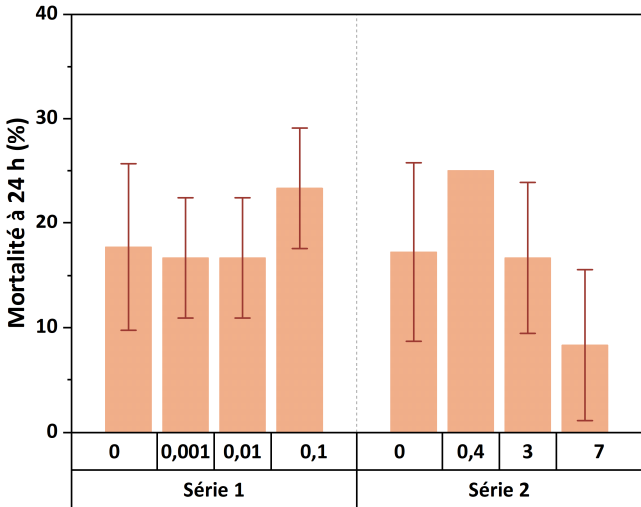


Figure 4.15: Mortalité des artémias exposées aux nanoplastiques pendant 24 h en fonction de la concentration d'exposition nominale.

La Figure 4.15 montre qu'il n'y a pas de relation de proportionnalité entre les mortalités recensées et la concentration d'exposition. La mortalité obtenue pour les contrôles n'est pas significativement plus faible que celle des organismes testés.

La mortalité, semble, en revanche, être corrélée avec le temps (cf. Annexe 15), et pourrait être expliquée par les contraintes imposées aux organismes lors de l'expérimentation (manipulations lors des prélèvements, privation de nourriture, pas de renouvellement du milieu, etc). Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait faire des tests plus rigoureux de toxicité aigüe, tel que celui détaillé dans la norme ISO/TS 20787 <sup>215</sup>. La toxicité n'étant pas l'objet de cette étude, ces tests n'ont pas été réalisés.

IV. 3. 4. Accumulation et dépuraction des nanoplastiques

IV. 3. 4. 1. Accumulation en fonction de la concentration d'exposition

Les quantités de nanoplastiques accumulés par les artémias, après 24 h d'exposition, ont été analysées, pour une large gamme de concentrations d'exposition (cf. série 1 et 2), et par deux méthodes d'analyse différentes : la Py-GC/MS et l'EA-IRMS. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.16, et sous forme de tableau (Tableau 4.11)

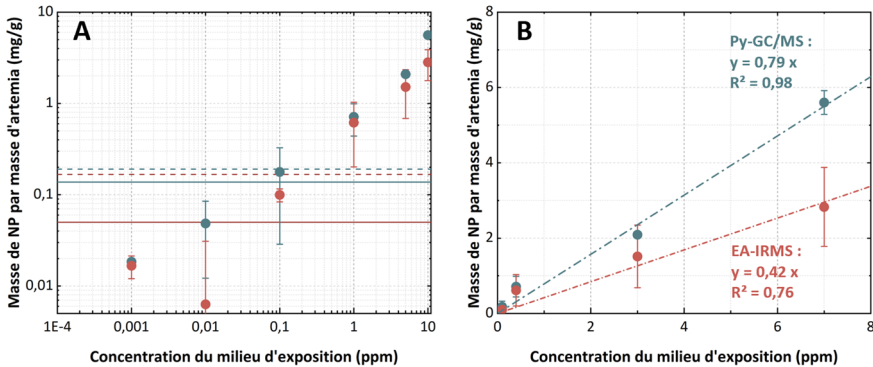


Figure 4.16: Masse de nanoplastiques accumulés après 24 h d'exposition, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), en fonction de la concentration d'exposition, et en fonction de la méthode d'analyse : Py-GC/MS (bleu) ou EA-IRMS (rouge), en représentation log-log (A) ou linéaire (B). Limite de détection (—), limite de quantification (---) et régression linéaire (----).

Les résultats quantitatifs obtenus sont en accord quelles que soient les techniques utilisées (Py-GC/MS et EA-IRMS). Cependant, des valeurs plus basses ont été systématiquement obtenues avec l'EA-IRMS, avec un décalage en moyenne de 34% si on prend les valeurs supérieures aux limites de détection des méthodes analytiques. Cette technique est plus sensible aux contaminations puisque tout apport en carbone non enrichi fera baisser le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'échantillon, ce qui pourrait expliquer les valeurs inférieures obtenues. En comparaison, en Py-GC/MS, le fragment suivi est un fragment spécifique du polymère marqué, la quantité détectée n'est pas interférée par la contamination éventuelle de l'échantillon.

La Figure 4.16 montre que l'accumulation des NP dans les artémias est proportionnelle à la concentration d'exposition. Il est à noter qu'aux plus faibles concentrations d'exposition, les quantités accumulées par les artémias sont inférieures aux limites de détection des deux méthodes d'analyse. Des régressions linéaires ont pu être appliquées pour les données des quatre concentrations les plus hautes (qui ont donné des résultats supérieurs aux LD), avec un coefficient de corrélation à 0,98 pour les données obtenues en Py-GC/MS. Les masses de nanoplastiques ne semblent pas atteindre de plateau mais on ne peut pas écarter qu'il y ait une capacité maximale d'accumulation pour les concentrations plus fortes que celles étudiées.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

**Tableau 4.11:** Masse de nanoplastiques accumulée après 24 h d'exposition, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), et facteur de bioconcentration (BCF) en fonction de la concentration d'exposition et de la méthode d'analyse : Py-GC/MS ou EA-IRMS.

Nom	Concentration d'exposition (ppm)	Masse de nanoplastiques accumulés par masse d'artémia (mg/g)		Facteur de Bioconcentration	
		EA-IRMS	Py-GC/MS	EA-IRMS	Py-GC/MS
C <sub>1</sub>	0,001	0,017 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,018 ± 0,002 <sup>a</sup>	17000 ± 5000 <sup>a</sup>	18000 ± 2000 <sup>a</sup>
C <sub>2</sub>	0,01	0,006 ± 0,025 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>b</sup>	600 ± 2000 <sup>b</sup>	5000 ± 4000 <sup>b</sup>
C <sub>3</sub>	0,1	0,1 ± 0,016 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	1000 ± 200 <sup>b</sup>	2000 ± 1000 <sup>b</sup>
C <sub>4</sub>	0,4	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,3	1400 ± 900	1300 ± 500
C <sub>5</sub>	3	1,5 ± 0,8	2,09 ± 0,07	500 ± 300	700 ± 20
C <sub>6</sub>	7	3 ± 1	5,6 ± 0,3	400 ± 100	800 ± 50

<sup>a</sup>valeurs < LD <sup>b</sup>valeurs < LQ

Les facteurs de bioconcentration (BCF) ont été calculés à partir des résultats obtenus pour chaque technique analytique, et sont reportés dans le Tableau 4.11. Si l'on s'intéresse uniquement aux concentrations dont les résultats sont supérieurs aux limites de détection ( $LD_{EA-IRMS} = 0,050$  mg/g et  $LD_{Py-GC/MS} = 0,034$  mg/g, avec une masse moyenne d'artémia de 275 µg), les BCF sont compris entre 400 et 1800 suivant la technique d'analyse. La convention OSPAR estime que les composés possèdent un réel risque lié à la bioaccumulation à partir d'un BCF de 500, alors le seuil est à 1000 pour la réglementation américaine TSCA et 2000 pour la réglementation européenne REACH.<sup>244</sup> La convention OSPAR et la réglementation TSCA classeraient ainsi les nanoplastiques comme bioaccumulables. Le seuil de la réglementation REACH, quant à lui, est dépassé pour la concentration 0,01 ppm. Comme discuté précédemment pour les données obtenues avec *D. magna*, ces résultats sont à nuancer. Néanmoins, ces résultats convergent vers la démonstration du risque de bioaccumulation des nanoplastiques par les artémias. Au vu de leur place importante dans certaines activités humaines, telle que l'aquaculture, l'accumulation des NP pourrait atteindre les êtres humains par transfert trophique.

### IV. 3. 4. 2. Cinétiques d'accumulation

Des cinétiques ont aussi été réalisées pour les concentrations d'exposition de 0,4, 3 et 7 ppm (série 2), avec trois temps d'exposition : 3 h, 6 h et 24 h. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.17. Un modèle de type exponentiel avec saturation (cf. l'équation 4.3) appliqué pour les trois concentrations ont permis l'obtention des paramètres des cinétiques présentés dans le Tableau 4.12.

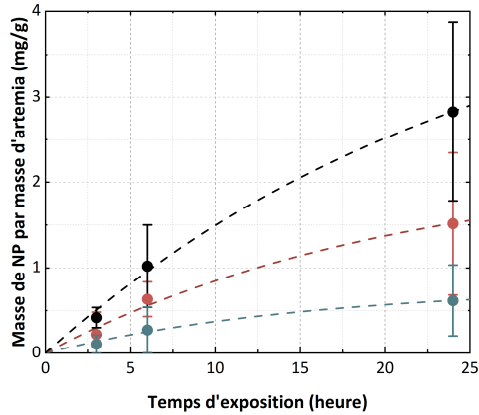


Figure 4.17: Masse de nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$ , par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), quantifiés par EA-IRMS, en fonction du temps d'exposition et de la concentration d'exposition : 0,4 ppm (bleu), 3,0 ppm (rouge) et 7 ppm (noir). Modèle de type exponentiel avec saturation (---) décrit par l'équation 4.3.

La figure 4.14 montre que l'accumulation est dépendante du temps : plus le temps d'exposition est long, plus les quantités détectées dans les organismes sont grandes. Il semble cependant s'établir un équilibre après un certain temps. On observe également que plus la concentration d'exposition est forte, plus la cinétique d'accumulation est rapide, ce qui se reflète avec les constantes de prise en charge  $k_u$ , obtenues avec le modèle de régression, qui sont croissantes : 0,05 ; 0,11 ; 0,18 heure $^{-1}$  pour les concentrations d'exposition de 0,4 ; 3,0 et 7 ppm respectivement (cf. Tableau 4.12). Le modèle donne également des capacités d'accumulation maximale (correspondant au plateau) dépendante de la concentration d'exposition avec des  $C_{\text{max}}$  de 0,8 ; 2,1 ; 4,8 mg/g respectivement.

Une cinétique plus détaillée a également été effectuée pour une concentration d'exposition moyenne de 0,47 ppm (série 3), avec un temps maximal d'exposition de 48 h. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.18 et dans le Tableau 4.12.

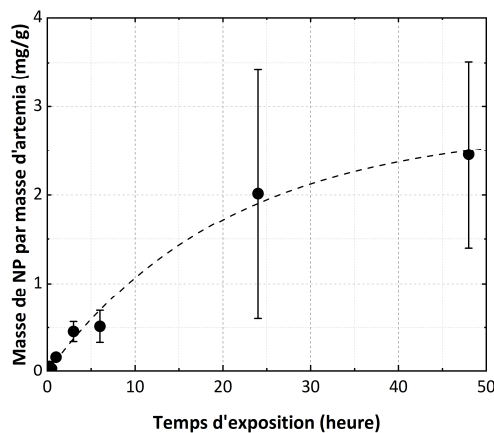


Figure 4.18: Masse de nanoplastiques, par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), quantifiés par EA-IRMS, en fonction du temps d'exposition (concentration d'exposition à 0,47 ppm). Modèle de type exponentiel avec saturation (---) décrit par l'équation 4.3.

## CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

Un modèle de type exponentiel avec saturation a également pu être appliqué pour cette cinétique détaillée (réalisée à une concentration moyenne d'exposition de 0,47 ppm), pour laquelle on obtient une capacité d'accumulation maximale élevée :  $C_{\max} = 2,8 \text{ mg.g}^{-1}$ , comparée à la concentration la plus proche de la série 2 ( $C_4$  de 0,4 ppm) qui était de  $0,8 \text{ mg.g}^{-1}$ .

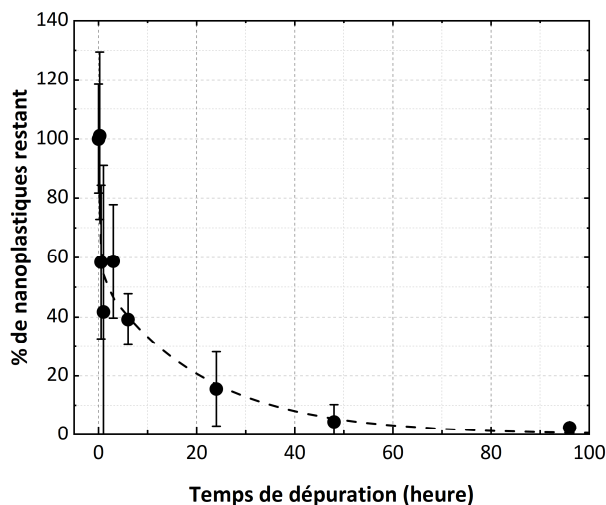
**Tableau 4.12:** Paramètres des cinétiques d'accumulation, estimés avec un modèle de type exponentiel avec saturation, décrit par l'équation 4.3.

	$C_{\text{moy}}$ (ppm)	$C_{\text{max}}$ (mg.g <sup>-1</sup> )	$k_u$ (heure <sup>-1</sup> )	$k_e$ (heure <sup>-1</sup> )	$R^2$
$C_4$	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,5$	$0,05 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,07$	0,54
$C_5$	$3,0 \pm 0,9$	$2,2 \pm 1,6$	$0,11 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,06$	0,77
$C_6$	$7 \pm 1$	$4,8 \pm 4,3$	$0,18 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,05$	0,84
$C_7$	$0,47 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,6$	$0,13 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,03$	0,74

Pour conclure, l'étude des cinétiques d'accumulation montre que l'accumulation est proportionnelle avec le temps d'exposition, avec un équilibre qui semble s'établir après un certain temps (~24 h). Plus les concentrations sont élevées, plus les cinétiques sont rapides, ce qui est cohérent avec les résultats de la partie IV. 3. 4. 2.

### IV. 3. 4. 3. Cinétique de dépuraction

Une cinétique de dépuraction a également été réalisée (cf. série 4) à l'aide d'artémias exposées à 0,4 ppm de nanoplastiques pendant 24 h, puis transférées dans de l'eau de mer non contaminée pendant maximum 4 jours (96 h) pour étudier la cinétique de dépuraction. Cette dépuraction a été faite dans des conditions se rapprochant au maximum des conditions environnementales, c'est-à-dire en circuit ouvert et en nourrissant les organismes tous les jours. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.19.



**Figure 4.19:** Cinétique de dépuraction des nanoplastiques exposés 24 h à 0,4 ppm puis transférés dans de l'eau de mer non contaminée : Masse résiduelle de nanoplastiques dans les artémias (en pourcentage) en fonction du temps de dépuraction. Modèle de type exponentiel à double composante (---) décrit par l'équation 4.4.

**CHAPITRE 4.** Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez  
*Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

La Figure 4.19 montre une nette diminution de la masse de nanoplastiques accumulés dans les organismes. A partir de 48 h d'exposition, les niveaux de  $\delta^{13}\text{C}$  sont très proches de ceux des artémias non exposées. Après 4 jours de dépuración, les niveaux de contamination passent en dessous de la limite de détection de la méthode et ne nous permettent plus de distinguer les artémias exposées des artémias témoin.

Un modèle de type exponentiel à double composante a pu être appliqué (cf. équation 4.4 et résultats dans le Tableau 4.13) sur cette cinétique de dépuración, avec un coefficient de corrélation de 0,78. Ce modèle part de l'hypothèse qu'il existe deux types de composés : des composés à résidence courte et des composés à résidence longue, c'est-à-dire dans notre cas des nanoplastiques éliminés rapidement, et des nanoplastiques accumulés de façon plus durable, voire permanente dans les artémias. Ici, le modèle rapporte une répartition assez équilibrée, avec environ 48% de nanoplastiques à résidence courte, associés à une constante de dépuración élevée ( $2,7 \text{ h}^{-1}$ ), et environ 53% à résidence longue, associés à une à une constante de dépuración faible ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ). Les temps de demi-vie biologique des composantes à résidence courte et longue, c'est à dire le temps au bout duquel 50% d'entre eux sont éliminés, ont été calculés à partir des constantes de dépuración à environ 15 min et 14 heures, respectivement.

L'étude de la dépuración montre donc que celle-ci peut être décomposée en deux temps, une dépuración très rapide et une dépuración plus lente ce qui pourrait impliquer une accumulation d'une partie des nanoplastiques de manière permanente même si l'exposition n'est que ponctuelle. Cependant, sur les 4 jours de dépuración, les artémias ont éliminé la majorité des nanoplastiques accumulés. Les niveaux étant en dessous de la limite de détection, il n'est pas pour l'instant possible de savoir si la totalité des nanoplastiques a été excrétée et si une partie des nanoplastiques a été assimilée.

**Tableau 4.13:** Paramètres des cinétiques d'accumulation, estimés avec un modèle de type exponentiel à double composant, décrit par l'équation 4.4, et temps de demi-vie des deux composants déterminés par l'équation 4.5.

	$C\%_{0c}$ (%)	$k_{ec}$ (heure <sup>-1</sup> )	$T_{b\frac{1}{2}c}$ (heure)	$C\%_{0l}$ (mg.g <sup>-1</sup> )	$k_{el}$ (heure <sup>-1</sup> )	$T_{b\frac{1}{2}l}$ (heure)	$R^2$
<b>C<sub>4</sub></b>	48 ± 12	2,7 ± 1,3	0,26 ± 0,13	53 ± 10	0,05 ± 0,03	14 ± 8	0,78

*IV. 3. 4. 4. Comparaison de l'accumulation chez les mâles et les femelles*

Jusqu'à présent, toutes les expériences ont été réalisées avec des mâles, afin d'éviter d'éventuelles fluctuations liées à un effet de genre. La dernière série avait donc pour but de déterminer si l'accumulation était différente selon le genre de l'organisme (mâle ou femelle). En effet, en plus de leur taille et leur poids qui sont en moyenne différents (cf. partie I. 1. 2. ), les femelles portent des œufs, qui peuvent jouer un rôle dans l'accumulation. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.20. Si on compare les valeurs pour une même concentration d'exposition, on voit que les femelles ont tendance à accumuler plus que leurs homologues masculins, bien que cette différence ne soit significative que pour la solution à 4,5 ppm.

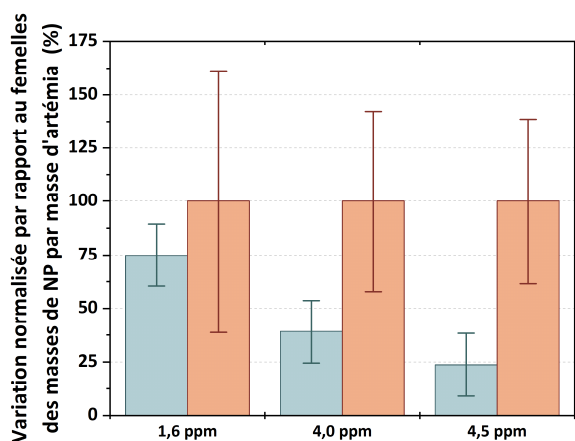


Figure 4.20: Masse de nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  accumulés par masse d'artémia (en mg/g, poids sec), en fonction du genre des organismes : mâles (bleu) ou femelles (rouge) et de la concentration d'exposition (1,6 ; 4,0 et 4,5 ppm), normalisée par rapport à la quantité mesurée dans les femelles. Quantification par EA-IRMS, avec n=4 réplicats.

#### IV. 4. Bilan de l'étude

Malgré la place importante que les organismes *Artemia sp.* ont dans l'environnement, le nombre d'études portant sur l'accumulation des nanoplastiques dans les artémias est faible et à notre connaissance, aucune n'utilise une méthode quantitative. En utilisant des nanoplastiques modèles par des atomes de carbone  $^{13}\text{C}$  (NP- $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100%) synthétisés au laboratoire, cette étude a permis de suivre des nanoplastiques dans les artémias, pour la première fois de manière quantitative, par EA-IRMS (et par Py-GC/MS).

Au travers de différences expériences, des artémias ont été exposées à des concentrations de nanoplastiques comprises entre 1 ppb à 7 ppm, pendant une durée maximale de 48 h. Aucune relation n'a été observée entre la mortalité des artémias et la concentration de nanoplastiques. La quantification des nanoplastiques a été testée à la fois avec la méthode développée à l'EA-IRMS et celle au Py-GC/MS. Les résultats obtenus avec les deux techniques sont en accord, mais l'EA-IRMS semble donner des résultats plus bas (en moyenne de 34%), potentiellement à cause des contaminations en carbone qui pourraient fausser l'analyse, contrairement à la méthode au Py-GC/MS, qui est plus spécifique. Globalement, l'accumulation des NP dans les artémias exposées pendant 24 h est proportionnelle à la concentration d'exposition, de manière linéaire, sans atteindre une capacité d'accumulation maximale, pour les concentrations les plus élevées et avec des valeurs en dessous des limites de détection pour les concentrations d'exposition les plus basses. Les facteurs de bioconcentration révèlent le caractère bioaccumulable des nanoplastiques (d'après les seuils donnés par la convention OSPAR et la réglementation TSCA). L'étude des cinétiques d'accumulation montre que l'accumulation est proportionnelle au temps d'exposition, et qu'un équilibre semble s'établir. Plus les concentrations sont élevées, plus les cinétiques sont plus rapides.

Au travers de la cinétique de dépuración, réalisée en circuit ouvert et en nourrissant les organismes tous les jours, une nette diminution de la masse de nanoplastiques accumulés dans les organismes est observée. Après 4 jours de dépuración, les niveaux de contamination passent en dessous de la

#### CHAPITRE 4. Etude de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques chez *Daphnia magna* et *Artemia sp.* à l'aide du marquage isotopique

---

limite de détection de la méthode et ne nous permettent plus de distinguer les artémias exposées des artémias témoin. D'après le modèle de type exponentiel à double composante appliqué sur la cinétique de dépuraction, celle-ci peut être décomposée en deux temps, une dépuraction rapide et une dépuraction plus lente, ce qui pourrait impliquer une assimilation d'une partie des nanoplastiques.

Enfin, les autres expériences ayant été réalisées uniquement avec des mâles, l'effet de genre a ensuite été étudié en exposant des mâles et des femelles aux mêmes concentrations de nanoplastique. Les nanoplastiques ont été retrouvés en plus grande quantité dans les femelles, ce qui indique que les niveaux d'accumulation observés dans les autres expériences ont été sous-estimés si l'on considère une population mixte ou composée uniquement de femelles. Il serait également intéressant d'étudier les cinétiques de dépuraction chez les femelles qui ont théoriquement une voie supplémentaire d'élimination via la production des œufs.

Les artémias étant utilisées dans l'aquaculture, il serait intéressant de tester le transfert trophique entre ces organismes et les espèces de niveaux trophiques plus élevés tels que des poissons destinés à l'alimentation humaine, afin d'évaluer les niveaux d'exposition auxquels les êtres humains pourraient être exposés.



## Conclusion

Les deux études présentées dans ce chapitre ont permis la quantification de nanoplastiques marqués au deutérium ou au carbone  $^{13}\text{C}$  dans des organismes planctoniques, grâce à la mise en application des deux méthodes de quantification, par Py-GC/MS et EA-IRMS, développées dans le Chapitre 3. Dans la première étude, l'accumulation et la toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de *D. magna* ont été étudiées grâce à la quantification des nanoplastiques marqués au deutérium par Py-GC/MS. Dans la deuxième étude, la Py-GC/MS et l'EA-IRMS ont été comparés pour suivre des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  accumulés par *Artemia sp.*

En termes de méthodes analytiques, les deux études ont montré le potentiel du marquage isotopique et des deux méthodes analytiques développées à l'aide de la Py-GC/MS ou l'EA-IRMS pour quantifier les nanoplastiques dans des matrices complexes. Si l'on compare les deux méthodes, la Py-GC/MS semble être la méthode la plus fiable puisqu'elle consiste à quantifier un fragment spécifique aux nanoplastiques marqués, contrairement à l'EA-IRMS qui mesure la signature isotopique globale de l'échantillon et qui est donc plus sensible aux contaminations, et risque donc de sous-estimer la teneur en nanoplastiques. Les deux méthodes ont tout de même permis une meilleure compréhension de l'accumulation et de la toxicité des nanoplastiques vis-à-vis de *D. magna* et *Artemia sp.*

Dans les deux cas, si la mortalité observée n'a pas été significative, l'accumulation des nanoplastiques dans les organismes est indiscutable, et d'autant plus forte que la concentration d'exposition est élevée. Pour les daphnies, aux plus fortes concentrations, une capacité maximale d'accumulation est observée, plateau qui n'est pas observé chez les artémias. Des facteurs de bioconcentration élevés ont été calculés grâce aux valeurs d'accumulation, témoignant d'une bioaccumulation probable dans les daphnies et les artémias. Au travers des cinétiques d'accumulation, réalisées avec des artémias, on a pu voir que l'accumulation est proportionnelle avec le temps d'exposition, avec un équilibre qui semble s'établir après un certain temps. Enfin, dans le cas des artémias, l'effet de genre a également été examiné et révèle une accumulation plus forte chez les femelles, ce qui indiquerait que les valeurs d'accumulation observés dans les autres expériences, réalisées uniquement avec des mâles, ont pu être un peu sous estimées.

La dépuración a également fait l'objet d'études, que ce soit avec les daphnies qui ont comparé une dépuración avec et sans nourriture, ou les artémias, pour lesquelles une cinétique de dépuración a été réalisée en circuit ouvert et en nourrissant les organismes tous les jours. Dans le cas des daphnies, l'apport de nourriture s'est révélé être un aspect important puisqu'il a permis une bien meilleure dépuración (95% au lieu de 50%). Avec les artémias, une nette diminution de la masse de nanoplastiques accumulés a été observée, avec, après 4 jours de dépuración, des niveaux de contamination passant en dessous de la limite de détection de la méthode et ne nous permettant plus de distinguer les artémias exposées des artémias témoin.

Il serait intéressant d'aller plus loin en étudiant le transfert trophique entre ces organismes, de niveaux trophiques assez bas, vers des espèces de niveaux trophiques plus élevés, notamment des espèces destinées à l'alimentation humaine, afin d'évaluer les niveaux d'exposition auxquels les êtres humains pourraient être exposés.







CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En raison de leur taille, les nanoplastiques représentent un risque pour l'environnement et le vivant, puisqu'en plus d'une probable ubiquité, ils peuvent potentiellement traverser certaines barrières biologiques et induire de la toxicité, directement ou en transportant d'autres contaminants. Il est donc important de comprendre les comportements de ces nanoplastiques, en particulier de leurs interactions avec le vivant. La quantification et la collecte des nanoplastiques dans des échantillons environnementaux restant encore un défi, l'utilisation de nanoplastiques modèles marqués permet d'étudier leur comportement lors d'expériences réalisées en laboratoire, tout en facilitant leur quantification dans des milieux complexes comme des organismes. Cependant, une attention toute particulière doit être portée sur le choix du marquage et les conditions d'élaboration des nanoplastiques modèles, pour obtenir des résultats fiables et représentatifs des échantillons naturels.

Au travers de ces travaux de thèse, nous avons souhaité montrer tout le potentiel du marquage isotopique, en particulier des isotopes stables, tels que le deutérium ou le carbone  $^{13}\text{C}$ , pourtant encore peu utilisés pour la quantification des débris plastiques, malgré leurs nombreux avantages. En effet, ce marquage permet de s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, que ce soit en termes de nature du polymère, de propriétés physico-chimiques ou de toxicité, sans risque de désorption du marqueur et en permettant une quantification en matrice environnementale.

Ainsi, dans la première partie de la thèse, des nanoplastiques modèles marqués au deutérium ou au carbone  $^{13}\text{C}$  ont été synthétisés par polymérisation en émulsion sans tensioactif, méthode qui permet, par l'ajout d'un comonomère hydrophile (ici l'acide acrylique) d'obtenir des nanoplastiques, sans tensioactif ou autres additifs, et chargés négativement en surface par des groupements carboxyles, imitant l'oxydation de surface des plastiques vieillissés dans la nature. Différents monomères et taux d'enrichissement ont été testés et ont révélé des effets isotopiques ayant un impact sur le rendement et les propriétés finales des nanoplastiques modèles (taille, dispersité, rugosité de surface). Ces effets isotopiques semblent être dépendants, non pas du nombre d'isotopes présents dans le monomère, mais surtout de leur position dans la molécule et de leur nature ( $^2\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ ). L'impact le plus important a été observé lorsque des isotopes étaient présents sur le groupement mis en jeu lors de la polymérisation des monomères, en particulier pour les deutériums. Malgré cet effet isotopique, des nanoplastiques marqués avec de hautes teneurs en deutérium et en carbone  $^{13}\text{C}$  ont été synthétisés, à partir des monomères styrène- $(^2\text{H})_5$  et styrène- $(^{13}\text{C})_6$  respectivement, avec des rendements en polymère supérieurs à 70%. Les nanoplastiques obtenus (NP- $(^2\text{H})_5$ -100% et NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100%) sont sphériques, monodisperses, de 129 nm et 214 nm de diamètre respectivement et ils possèdent environ 9 et 13 groupements carboxyle par  $\text{nm}^2$  à leur surface, conduisant à une surface plutôt lisse dans le premier cas et plutôt rugueuse dans le deuxième. Leur stabilité dans des milieux d'intérêt et la proportion en poly(acide acrylique) totale des NP- $(^{13}\text{C})_6$ -100% a également été étudiée en vue de leur utilisation dans des études écotoxicologiques.

Après avoir synthétisé et caractérisé les nanoplastiques marqués à l'isotopie, deux méthodes analytiques ont été développées pour les quantifier. La première méthode consiste à quantifier un fragment spécifique, produit lors de la pyrolyse incomplète du polystyrène, à l'aide de la Py-GC/MS, technique couramment utilisée pour quantifier les micro-et nanoplastiques. La seconde méthode, développée avec l'EA-IRMS, permet de remonter à la concentration en nanoplastiques d'un mélange inconnu à partir de la signature isotopique de ce dernier, des signatures isotopiques et les pourcentages de carbone des nanoplastiques de la matrice non contaminée. Après une étude

théorique préalable, les deux méthodes ont été testées en conditions réelles avec différents types de matrices organiques, allant de matrices simples comme l'acide humique ou l'alginate à des matrices plus complexes comme les organismes *Daphnia magna*, *Artemia sp.* ou encore *Mytilus edulis*. La méthode développée au Py-GC/MS permet la quantification de nanoplastiques à partir de 18 ng de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% et 47 ng de NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100%, et aucun effet de matrice n'a été observé pour les matrices organiques étudiées. La limite de quantification de la méthode développée à l'EA-IRMS a quant à elle été calculée à 0,167 mg/g, soit 42 ng de NP-(<sup>13</sup>C)<sub>6</sub>-100% pour une artémia de masse sèche égale à 250 µg. Les effets de matrice ont également été étudiés, avec de faibles effets observés pour l'acide humique et l'alginate et pas d'effets significatifs pour les *Artemia sp.*

Enfin, dans la dernière partie de la thèse, les nanoplastiques marqués à l'isotopie et les méthodes de quantification associées ont été utilisés pour deux études écotoxicologiques portant sur des crustacés planctoniques. La première étude a porté sur l'accumulation et la toxicité de nanoplastiques vis-à-vis de *Daphnia magna* et a été réalisée avec des nanoplastiques marqués au deutérium, quantifiés par Py-GC/MS. La seconde étude a porté sur l'accumulation de nanoplastiques marqués au carbone <sup>13</sup>C par *Artemia sp.* quantifiés par EA-IRMS et Py-GC/MS. Dans les deux cas, si la mortalité observée n'a pas été significative, l'accumulation des nanoplastiques dans les organismes est indiscutable. Pour les daphnies, une capacité d'accumulation maximale, estimée à environ 518 ng par daphnie, a été observée aux concentrations d'exposition les plus fortes (à partir de 35,5 ppm). Cette observation n'a pas été faite chez les artémias, pour lesquelles l'accumulation est directement proportionnelle à la concentration d'exposition. Des facteurs de bioconcentration élevés ont été calculés pour les deux espèces (entre 1600 et 43000 pour les daphnies et entre 700 et 18000 pour les artémias). Les cinétiques d'accumulation chez ces dernières ont en revanche mis en évidence une quantité maximale d'accumulation après un certain temps, atteignant par exemple 2,8 mg.g<sup>-1</sup> pour une concentration d'exposition de 0,47 ppm. Une différence d'accumulation entre les mâles et les femelles a également été observée, plus forte chez ces dernières. Enfin, la dépuraton a été étudiée, que ce soit avec les daphnies, pour lesquelles la présence d'algues s'est révélée être un aspect important permettant une bien meilleure dépuraton (95% au lieu de 50%), mais aussi pour les artémias, qui ont montré une nette diminution de la masse de nanoplastiques accumulés jusqu'à des niveaux de contamination passant en dessous de la limite de détection de la méthode après 4 jours de dépuraton.

Ces travaux de thèse ont montré tout le potentiel du marquage au deutérium ou au carbone <sup>13</sup>C, au travers d'une étude complète allant de l'élaboration des nanoplastiques modèles marqués, en passant par le développement analytique des méthodes de quantification, jusqu'à leur utilisation en conditions réelles en présence de crustacés planctoniques. Ces deux études écotoxicologiques, qui ont apporté des réponses sur les interactions entre des consommateurs primaires et les nanoplastiques, sont deux exemples parmi les nombreuses d'études qui pourraient être réalisées à l'aide de ces nanoplastiques marqués à l'isotopie. En premier lieu, il serait intéressant de poursuivre ces travaux en étudiant le transfert trophique entre les crustacés planctoniques et leurs consommateurs secondaires, des poissons par exemple, pour évaluer si une bioamplification est observée. Par ailleurs, ces nanoplastiques pourraient aussi être utilisés pour des études portant sur leur transport dans différentes matrices complexes, comme des sols. Dans tous les cas, il faudra s'assurer de l'absence d'effets de matrice, ou autres interférences, pour les matrices concernées.

En termes d'outils analytiques, le marquage au deutérium ou au carbone <sup>13</sup>C donne accès à de nombreuses techniques analytiques, autres que la Py-GC/MS ou l'EA-IRMS, qui permettraient

potentiellement de détecter ou quantifier ces nanoplastiques. Par exemple, il a été montré que la détection du carbone  $^{13}\text{C}$  par ICP-MS en mode *Single Particule* permettait de quantifier des microplastiques ayant une taille minimale de  $1,2\ \mu\text{m}$  et une concentration minimale de 100 particules par mL.<sup>251</sup> Cette technique a été testée pour quantifier les nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  présentés dans ces travaux de thèse. Cependant, compte tenu de leur taille, du bruit de fond élevé détecté par l'appareil et de la faible sensibilité de l'analyse pour le carbone (à cause d'une efficacité d'ionisation faible), la quantification de ces nanoplastiques n'a pas été possible dans le cadre de ces travaux de thèse. D'autres techniques n'ont en revanche pas pu être testées pendant la thèse, mais mériteraient de l'être. On peut par exemple citer l'EA-IRMS qui serait aussi prometteuse pour la quantification des nanoplastiques deutérés, ou encore des techniques de spectrométrie de masse qui permettraient d'augmenter la sensibilité et d'atteindre des concentrations plus basses. Il existe également des techniques d'imagerie qui pourraient compléter les méthodes mises en place lors de cette thèse. Parmi elles, on retrouve des techniques classiques comme la microscopie TEM mais aussi l'imagerie de précision NanoSIMS (de l'anglais *Nanoscale secondary ion mass spectrometry*) qui pourraient permettre de suivre spécifiquement le carbone  $^{13}\text{C}$  dans les tissus d'organismes.<sup>252,253</sup> D'autres techniques plus exploratoires sont envisageables comme la RMN ou l'IRM qui pourraient potentiellement être utilisées sur les nanoplastiques marqués au deutérium,<sup>254,255</sup> ou au carbone  $^{13}\text{C}$ , bien que l'opération semble plus compliquée pour ces derniers qui ont besoin d'être hyperpolarisés pour être détectables, ce qui est difficile dans le cas de particules solides.<sup>255,256</sup> Dans le cas des nanoplastiques marqués au deutérium, on peut également citer des techniques basées sur la spectroscopie Raman, comme la microscopie à diffusion Raman stimulée (SRS de l'anglais *Stimulated Raman scattering*).<sup>257,258</sup> Ces techniques, associées aux méthodes mises en place pendant cette thèse seraient notamment très utiles pour visualiser une potentielle translocation des nanoplastiques et ainsi apporter des réponses supplémentaires quant au risque qu'ils représentent pour l'environnement et la santé humaine.

En termes d'élaboration de nanoplastiques modèles, nous avons vu que le marquage à l'aide d'isotopes stables est optimal pour obtenir des nanoplastiques marqués avec des propriétés les plus proches possibles des nanoplastiques non marqués. La polymérisation en émulsion sans tensioactif à partir de styrène enrichi en deutérium et en carbone  $^{13}\text{C}$  a permis de synthétiser des nanoplastiques modèles sphériques et monodisperses qui ont pour avantages de se comporter de manière homogène sur tout l'échantillon, et de permettre l'accès aux concentrations en masse, en nombre et en surface. Leur surface rugueuse leur permet de se rapprocher des nanoplastiques environnementaux mais pas complètement puisque ces derniers sont polymorphiques et polydisperses. Il serait donc intéressant de produire, par une méthode descendante (*top-down*), des nanoplastiques modèles marqués à l'isotopie plus proches des nanoplastiques environnementaux en termes de forme et de dispersité en taille, afin de pouvoir comparer leur comportement. En ce qui concerne la nature du polymère, il serait également intéressant de préparer d'autres types de nanoplastiques, comme des NP de polyéthylène, de polypropylène ou de PVC. Il n'est pas possible de préparer des tels nanoplastiques par la méthode de la polymérisation en émulsion sans tensioactif en raison des propriétés des monomères (point d'ébullition, solubilité dans l'eau, hydrophobie, etc.). Il faudrait donc se tourner vers d'autres procédés telle que la nanoprécipitation et ainsi permettre de comparer les comportements des nanoplastiques en fonction de leur nature.





## ANNEXES

### Annexe 1: Paramètres techniques des analyses de Py-GC/MS.

	Appareil n°1	Appareil n°2
<b>Pyrolyse</b>	<b>PY-3030D (Frontier Lab)</b>	<b>PY-3030D (Frontier Lab)</b>
Température de pyrolyse	500°C	500°C
Temps de pyrolyse	1 min	1 min
Température d'interface	300°C	300°C
<b>Chromatographie gazeuse</b>	<b>GC Agilent 7890B (Agilent)</b>	<b>GC-2010 Plus (Shimadzu)</b>
Température du port d'injection	300°C	300°C
Septum Purge Flow	3 mL.min <sup>-1</sup>	6 mL.min <sup>-1</sup>
Mode d'injection	Split	Split
Split ratio	50 :1	50 :1
Split Flow	50 mL.min <sup>-1</sup>	50 mL.min <sup>-1</sup>
Gas Saver	20mL/min après 2min	Split ratio 1:10 après 2 min
Colonne	Colonne DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm, Agilent)	Colonne DB5-HT (30m x 0.25mm x 0.25µm, Agilent)
Débit de gaz vecteur	1 mL.min <sup>-1</sup>	1 mL.min <sup>-1</sup>
Température du four initiale	50°C	50°C
Programme de température	50°C (2,5 min) à 320°C (4 min) at 20°C/min => total : 20 min	50°C (2,5 min) à 320°C (4 min) at 20°C/min => total : 20 min
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
<b>Spectrométrie de masse</b>	<b>MS 5977B (Agilent)</b>	<b>QCMS-QP2010 SE (Shimadzu)</b>
Température de l'interface	300°C	300°C
Ionisation	EI	EI
Température de la source d'ionisation	230°C	250°C
<b>Mode SCAN</b>		
Start Mass	40	40
End Mass	350	350

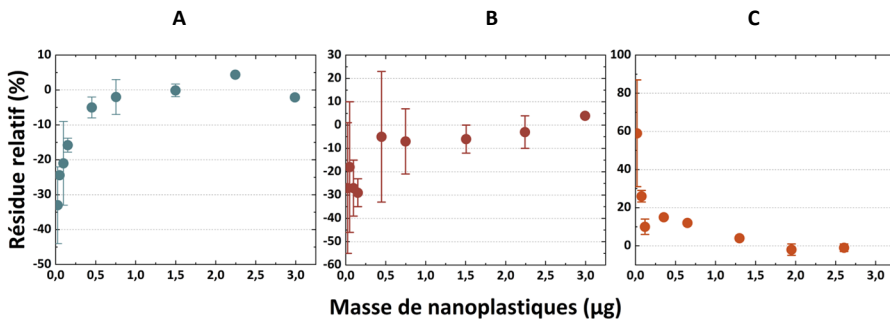
**Annexe 2:** Liste des matériaux de référence certifiés, ou matériaux de référence internes, utilisés lors des analyses en EA-IRMS ou en analyse élémentaire, et leurs caractéristiques.

EA-IRMS		Analyse élémentaire	
Matériaux de référence	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Matériaux de référence	%C
PEF 1	-31,82	Taurine	19,20%
USGS40	-26,39	Nicotinamide	59,01%
Sucrose	-10,37	Tryptophane	64,69%
USGS41a	36,55	Acétanilide	71,09%
Vanilline (référence interne)	815	Glycine	36,36%
-	-	Cystine	29,91%

**Annexe 3:** Annotation des fragments produits lors de l'analyse en Py-GC/MS du polystyrène.

Notation	Molécule	m/z pour les NP
T	Toluène	92
S	Styrène (monomère)	104
AB	Allylbenzène	118
$\alpha$ -S	$\alpha$ -méthylstyrène	118
D1	C(Ph)-C-Ph	182
D2	C(Ph)-C-Ph	196
D3	C=C(Ph)-C-Ph	208
D4	C(Ph)-C-C-Ph	196
SS	C=C(Ph)-C-C-Ph (dimère)	208
D5	C=C(Ph)-C-C(Ph)-C	222
D6	C(Ph)=C-C-C-Ph	208
D7	C=C(Ph)-C-C-C(Ph)=C	234
SSS	C=C(Ph)-C-C(Ph)-C-C-Ph (trimère)	312

**Annexe 4:** Résidus relatifs des calibrations pour NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% (A-bleu), NP-( $^{13}\text{C}$ )<sub>6</sub>-100% (B-rouge) et NP-TA-( $^2\text{H}$ )<sub>8</sub>-100% (C-orange), avec suivi des fragments de styrène marqué majoritaire, soit m/z=109, 110 et 112, respectivement. Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Shimadzu (GCMS-QP2010 SE), en mode SIM.



**Annexe 5:** Intensité relative des fragments de masses comprises entre 104 et 111, calculées à partir des aires des pics, par rapport à l'aire la plus intense, après pyrolyse de différentes masses de NP-( $^2\text{H}$ )<sub>5</sub>-100% avec et sans apports d'ions. Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN, pyrolyse à 500°C et split 1:50.

m/z	Sans apport d'ions		Avec apports d'ions	
	50 ppm	15 ppm	50 ppm	100 ppm
104	0,4%	0,7%	0,4%	0,4%
105	1,5%	1,5%	1,4%	1,4%
106	4,4%	4,5%	4,0%	4,0%
107	22,6%	22,8%	21,9%	22,2%
108	29,8%	31,2%	28,8%	28,9%
109	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
110	13,0%	12,9%	13,2%	13,4%
111	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%

**Annexe 6:** Intensité relative des fragments de masses comprises entre 101 et 112, calculées à partir des aires des pics, par rapport à l'aire la plus intense, après pyrolyse de différentes masses de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% sans et avec matrice *Daphnia magna* (20 organismes, soit en moyenne 145 µg). Analyses réalisées à l'aide d'un PY-GC/MS Frontier Lab (3030D) – Agilent (5977B), en mode SCAN, pyrolyse à 500°C et split 1:50.

m/z	Sans matrice		Avec matrice ( <i>Daphnia magna</i> )	
	50 ppm	15 ppm	50 ppm	100 ppm
101	0,1%	0,4%	0,1%	0,1%
102	0,0%	1,0%	0,4%	0,2%
103	0,1%	5,4%	2,0%	1,2%
104	<b>0,4%</b>	<b>11,6%</b>	<b>4,4%</b>	<b>2,8%</b>
105	1,5%	2,9%	2,0%	1,7%
106	4,4%	6,9%	4,7%	4,4%
107	22,6%	22,6%	22,0%	22,6%
108	29,8%	28,9%	28,5%	29,1%
109	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>
110	13,0%	13,1%	13,1%	13,5%
111	0,8%	1,5%	1,1%	0,9%
112	0,0%	0,5%	0,2%	0,1%

**Annexe 7:** Explication détaillée de l'obtention de l'équation 3.12.

$$x(C)_A = \frac{n(C)_A}{n(C)_A + n(C)_B}$$

$$x(C)_A = \frac{\frac{m_A}{M(C)_A}}{\frac{m_A}{M(C)_A} + \frac{m_B}{M(C)_B}}$$

$$x(C)_A = \frac{\frac{w_A \times \%C_A}{M(C)_A}}{\frac{w_A \times \%C_A}{M(C)_A} + \frac{w_B \times \%C_B}{M(C)_B}}$$

$$x(C)_A = \frac{w_A}{w_A + w_B \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B}}$$

$$x(C)_A = \frac{w_A}{w_A + (1 - w_A) \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B}}$$

$$x(C)_A = \frac{w_A}{w_A - w_A \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B} + \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B}}$$

$$x(C)_A = \frac{1}{1 - \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B} + \frac{1}{w_A} \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B}}$$

$$\frac{1}{x(C)_A} = \frac{1}{w_A} \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B} + 1 - \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B}$$

Or, à titre d'exemple pour la substance A :

$$M(C)_A = 12 \times x(^{12}C)_A + 13 \times x(^{13}C)_A$$

$$M(C)_A = 12 \times (1 - x(^{13}C)_A) + 13 \times x(^{13}C)_A$$

$$M(C)_A = 12 - 12 \times x(^{13}C)_A + 13 \times x(^{13}C)_A$$

$$M(C)_A = 12 + (13 - 12) \times x(^{13}C)_A$$

$$M(C)_A = 12 + x(^{13}C)_A$$

Donc :

$$\frac{1}{x(C)_A} = \frac{1}{w_A} \times \frac{\%C_B \times M(C)_A}{\%C_A \times M(C)_B} + 1 - \frac{\%C_B \times (12 + x(^{13}C)_A)}{\%C_A \times (12 + x(^{13}C)_B)}$$

$$\frac{1}{x(C)_A} = \left( k \times \frac{1}{w_A} \right) + 1 - k$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_B(12 + x(^{13}C)_A)}{\%C_A(12 + x(^{13}C)_B)}$$

**Annexe 8:** Explication détaillée de l'obtention de l'équation 3.13.

$$x(^{13}C)_{AB} = x(C)_A \times x(^{13}C)_A + x(C)_B \times x(^{13}C)_B \quad (3.11)$$

$$x(^{13}C)_{AB} = x(C)_A \times x(^{13}C)_A + (1 - x(C)_A) \times x(^{13}C)_B$$

$$x(^{13}C)_{AB} = (x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B) \times x(C)_A + x(^{13}C)_B$$

$$\frac{1}{x(^{13}C)_{AB} - x(^{13}C)_B} = \frac{1}{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B} \times \frac{1}{x(C)_A}$$

Or :

$$\frac{1}{x(C)_A} = \left( k \times \frac{1}{w_A} \right) + 1 - k \quad (3.12)$$

$$\text{Avec } k = \frac{\%C_B(12 + x(^{13}C)_A)}{\%C_A(12 + x(^{13}C)_B)}$$

Donc :

$$\frac{1}{x(^{13}C)_{AB} - x(^{13}C)_B} = \left( \frac{1}{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B} \times k \right) \times \frac{1}{w_A} + \frac{1}{x(^{13}C)_A - x(^{13}C)_B} \times (1 - k)$$

**Annexe 9:** Schéma des plaques utilisées pour l'exposition des daphnies en fonction des différentes conditions étudiées.

**Condition 1 : pas de déuration**

Plaque 1					Plaque 2				
Rinçage	Réplicat 1			Réplicat 2		Réplicat 3			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
36	36	36	36	36	36	36	36	36	36

**Condition 2 : déuration sans algues**

Plaque 3				
Rinçage - 0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Rinçage - 4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
Rinçage - 36	36	36	36	36
36	36	36	36	36

**Condition 3 : déuration avec algues**

Plaque 4					Plaque 5				
Rinçage	Réplicat 1			Réplicat 2		Réplicat 3			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
36	36	36	36	36	36	36	36	36	36

Plaque 6				
Rinçage	Daphnies pour microscopie			Puits sans daphnies
	Condition 1	Condition 2	Condition 3	
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
36	36	36	36	36
36	36	36	36	36

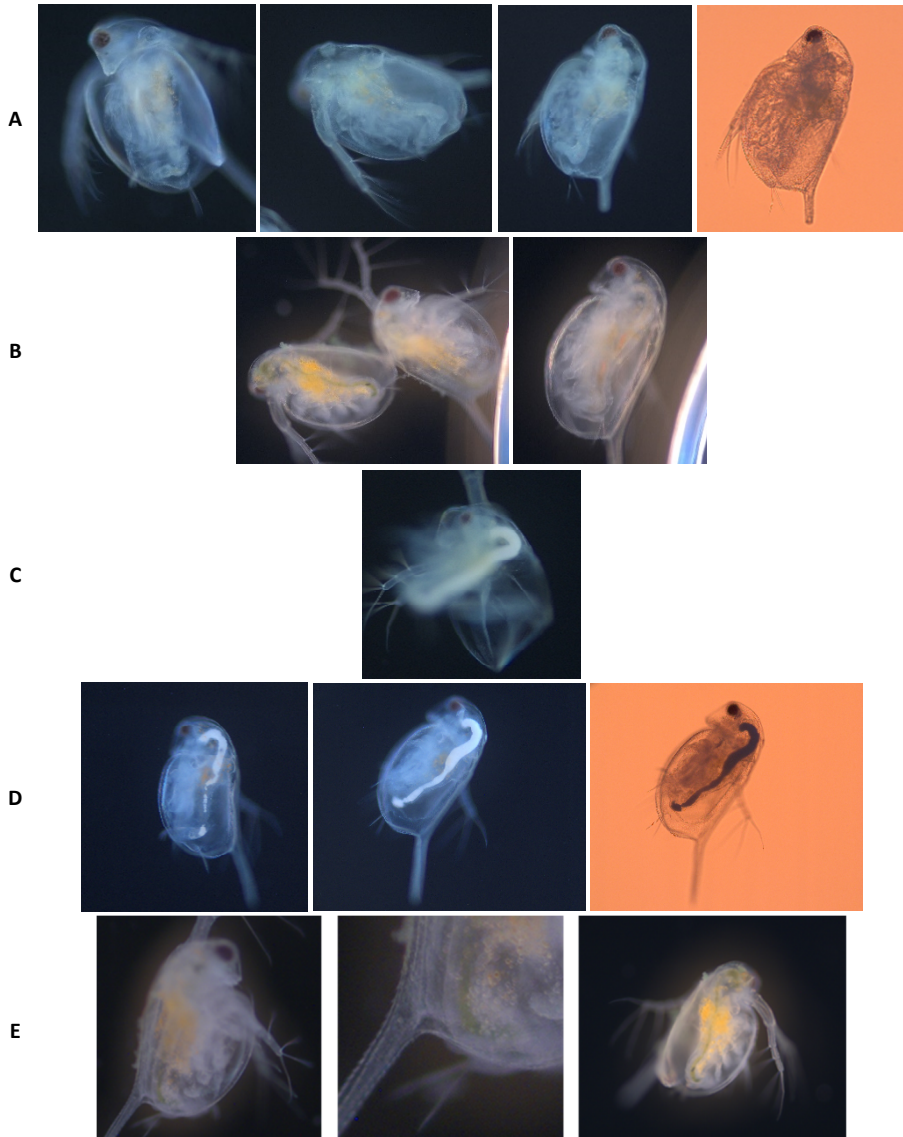
**Annexe 10:** Nombre d'individus immobilisés pour chaque puits (pour un total de 5 daphnies par puits).

	Concentration (ppm)	A	B	C	D	Nombre d'individus immobilisés (%)
<b>Plaque 1</b>	0	0	0	0	0	0 %
	0,1	0	0	0	0	0 %
	1	0	0	0	0	0 %
	10	0	0	0	0	0 %
	20	1	0	0	0	5 %
	50	0	0	0	0	0 %
<b>Plaque 2</b>	0	0	1	0	0	5 %
	0,1	0	0	0	0	0 %
	1	0	1	0	0	5 %
	10	0	0	1	1	10 %
	20	1	0	0	0	5 %
	50	0	0	1	0	5 %
<b>Plaque 3</b>	1	0	0	0	0	0 %
	1	0	0	1	0	5 %
	10	0	0	1	1	1 %
	10	1	1	0	0	10 %
	50	0	1	0	0	5 %
	50	0	0	0	0	0 %
<b>Plaque 4</b>	0	0	0	0	0	0 %
	0,1	0	0	0	0	0 %
	1	0	0	0	0	0 %
	10	0	0	0	0	0 %
	20	0	1	0	0	5 %
	50	1	1	0	0	10 %
<b>Plaque 5</b>	0	0	1	0	0	5 %
	0,1	0	0	0	0	0 %
	1	0	0	0	0	0 %
	10	0	0	0	0	0 %
	20	0	0	0	0	0 %
	50	0	0	0	0	0 %

**Annexe 11:** Masse de nanoplastiques deutérés quantifiés par Py-GC/MS en mg/g (masse sèche), en fonction de la concentration moyenne du milieu d'exposition, et en fonction des conditions de dépuración : pas de dépuración, dépuración en milieu sans NP sans algues, dépuración en milieu sans NP avec algues.

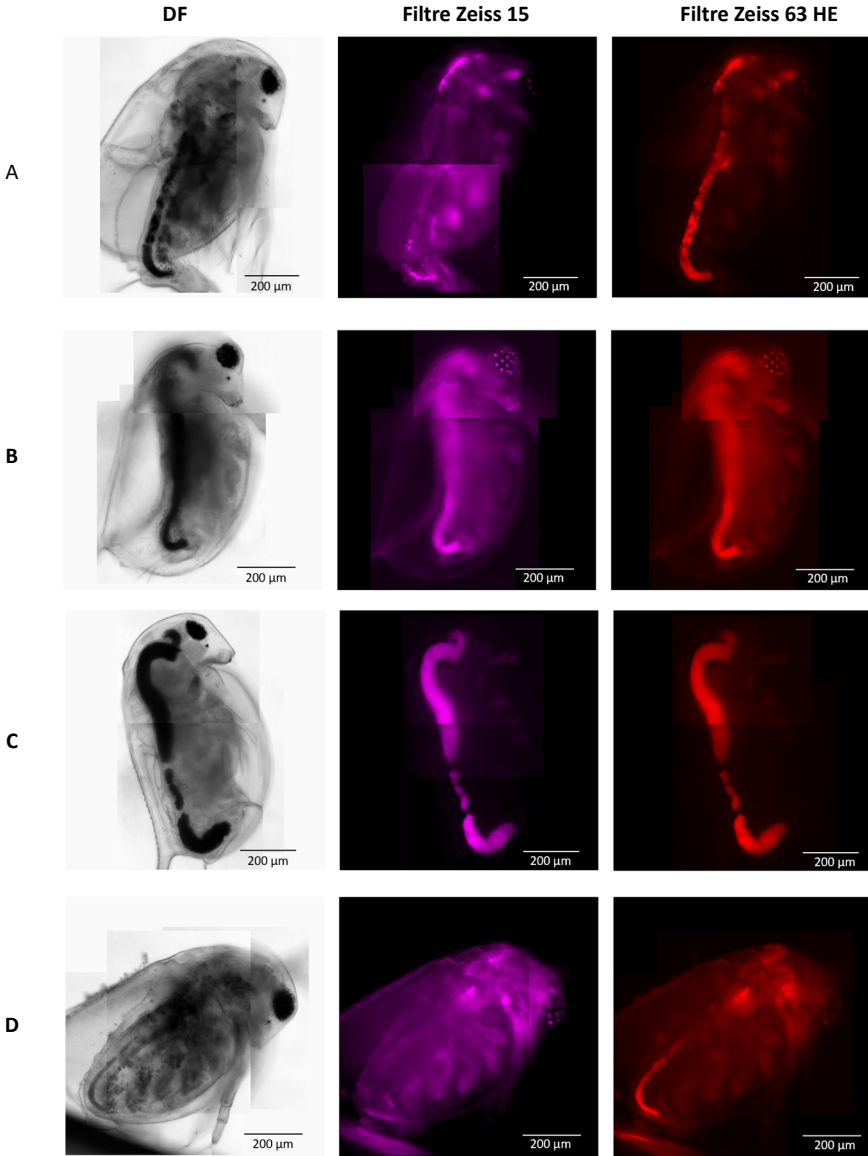
Nom	Concentration d'exposition (ppm)	Condition 1 :	Condition 2 :	Condition 3 :
		Pas de dépuración	Dépuración sans algues	Dépuración avec algues
		(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
<b>C<sub>0</sub></b>	<b>0,00</b>	0 ± 0	-	0 ± 0
<b>C<sub>1 corr</sub></b>	<b>0,02</b>	0,9 ± 0,1	-	0,01 ± 0,02
<b>C<sub>2 corr</sub></b>	<b>0,3</b>	6,3 ± 0,4	3 ± 1	0,015 ± 0,004
<b>C<sub>3 corr</sub></b>	<b>4,6</b>	37 ± 3	13 ± 9	1 ± 2
<b>C<sub>4 corr</sub></b>	<b>11,2</b>	43 ± 15	-	1 ± 1
<b>C<sub>5 corr</sub></b>	<b>35,5</b>	58 ± 5	29 ± 10	3 ± 4

**Annexe 12:** Images supplémentaires de microscopie optique en mode darkfield et brightfield (DF et BF) de *Daphnia magna* après 24 h d'exposition à 0 ppm (Témoin sans algues – A et Témoin avec algues -B) ou 36 ppm de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (C - E) ou selon les conditions de dépuración suivantes : pas de dépuración (C), dépuración sans algues (D), dépuración avec algues (E).

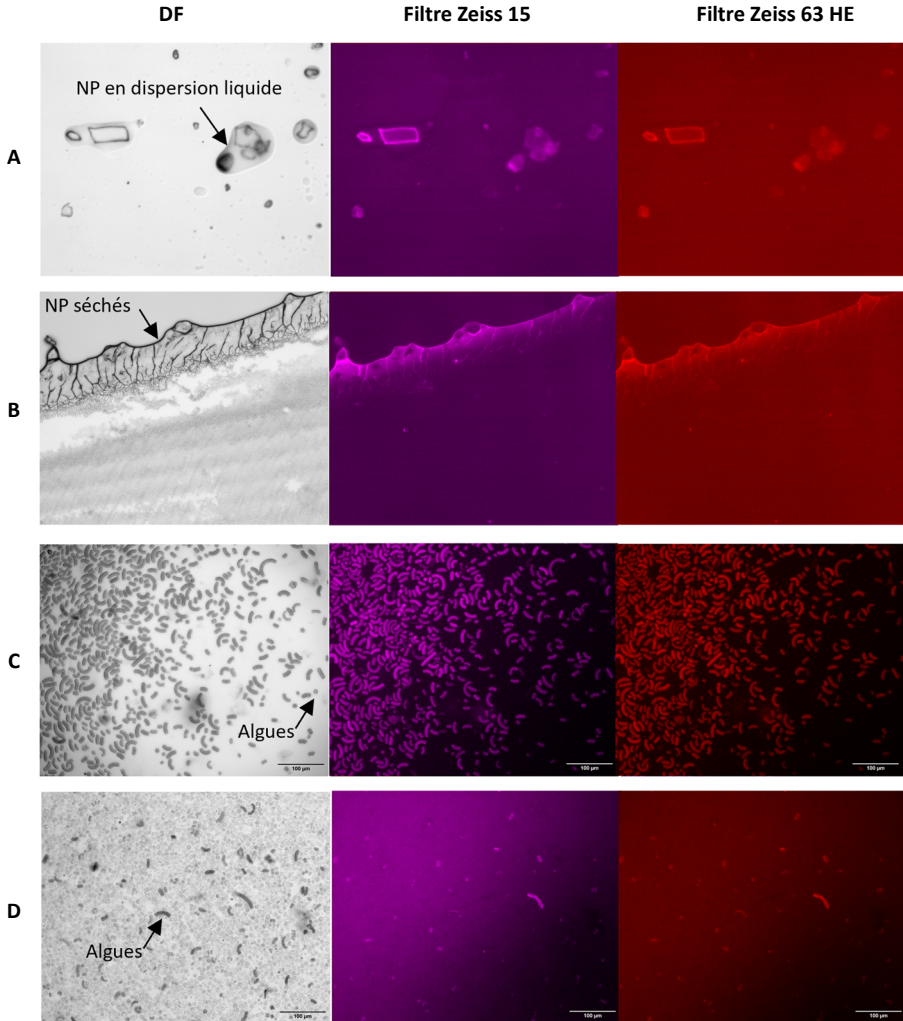




**Annexe 13:** Images de microscopie de fluorescence (échelle = 200 µm) de *Daphnia magna* après 24 h d'exposition à 0 ppm (Témoin - A) ou à 36 ppm de NP-(<sup>2</sup>H)<sub>5</sub>-100% (B - D) ou selon les conditions de dépuración suivantes : pas de dépuración (B), dépuración sans algues (C), dépuración avec algues (A et D).



**Annexe 14:** Images de microscopie de fluorescence de nanoplastiques en dispersion liquide (A) ou séchés (B) et des algues utilisées pour nourrir les daphnies avant (C) ou après sonication (D). Echantillons exposés pendant 1500 ms et 800 ms pour les filtres 63 HE (violet) et 15 (rouge) respectivement (A-B) ou 150 ms et 80 ms respectivement (C-D).



**Annexe 15:** Mortalités recensées lors des séries 1, 2, 3, 4 et 5 d'exposition des artémias aux nanoplastiques.

Exp n°1	CTRL			0,001 ppm			0,01 ppm			0,1 ppm		
Organismes:	t0	0h	24h	t0	0h	24h	t0	0h	24h	t0	0h	24h
Morts	0	0	2	0	0	5	0	0	5	0	0	7
Prélevés	0	1	3	0	0	6	0	0	6	0	0	6
Total*	10	9	4	30	30	19	30	30	19	30	30	17
% mortalité		0	22		0	17		0	17		0	23

Exp n°2	CTRL					1 ppm					5 ppm					10 ppm					
Organismes:	t0	0h	3h	6h	24h	t0	0h	3h	6h	24h	t0	0h	3h	6h	24h	t0	0h	3h	6h	24h	
Morts	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	2
Prélevés	0	1	0	0	5	0	0	3	3	8	0	0	3	3	6	0	0	3	3	3	8
Total*	10	9	9	9	3	30	30	27	24	10	30	30	27	24	14	30	30	27	24	14	
% mortalité		0	0	0	11		0	0	0	25		0	0	0	17		0	0	0	8	

Exp n°3	CTRL									1 ppm								
Organismes:	t0	0h	0,25	0,5	1h	3h	6h	24h	48h	t0	0h	0,25	0,5	1h	3h	6h	24h	48h
Morts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1
Prélevés	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	3	3	3	3	3	3
Total*	10	9	9	9	9	9	9	8	7	30	30	27	24	21	18	15	8	4
% mortalité		0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	27	13

Exp n°4	CTRL										1 ppm									
Organismes:	t0 exp	0h	0,25	0,5	1h	3h	6h	24h	48h	4j	t0 exp	0h	0,25	0,5	1h	3h	6h	24h	48h	4j
Morts	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8	0	0	0	0	0	1	0	1
Prélevés	0	2	0	0	0	0	0	4	2	2	0	9	3	3	3	3	3	8	3	5
Total*	15	11	11	11	11	11	11	7	4	2	50	33	30	27	24	21	18	9	6	0
% mortalité		13	0	0	0	0	0	0	14	0			0	0	0	0	0	6	0	17

Exp n°5	5 ppm		
Organismes:	t0	0h	24h
Morts	0	0	0
Prélevés	0	0	24
Total*	24	24	0
% mortalité		0	0

\* Total après décompte des morts et des prélèvements.



---

## **RÉFÉRENCES**

### **BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* **3**, e1700782 (2017).
2. Masry, M. *et al.* Characteristics, fate, and impact of marine plastic debris exposed to sunlight: A review. *Marine Pollution Bulletin* **171**, 112701 (2021).
3. Mattsson, K., Björkroth, F., Karlsson, T. & Hassellöv, M. Nanofragmentation of Expanded Polystyrene Under Simulated Environmental Weathering (Thermooxidative Degradation and Hydrodynamic Turbulence). *Front. Mar. Sci.* **7**, 578178 (2021).
4. Dawson, A. L. *et al.* Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nat Commun* **9**, 1001 (2018).
5. Obbard, R. W. *et al.* Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future* **2**, 315–320 (2014).
6. Materić, D. *et al.* Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice. *Environmental Research* **208**, 112741 (2022).
7. Zhang, Y., Gao, T., Kang, S. & Sillanpää, M. Importance of atmospheric transport for microplastics deposited in remote areas. *Environmental Pollution* **254**, 112953 (2019).
8. Materić, D. *et al.* Micro- and Nanoplastics in Alpine Snow: A New Method for Chemical Identification and (Semi)Quantification in the Nanogram Range. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 2353–2359 (2020).
9. Dong, X., Liu, X., Hou, Q. & Wang, Z. From natural environment to animal tissues: A review of microplastics(nanoplastics) translocation and hazards studies. *Science of The Total Environment* **855**, 158686 (2023).
10. Gigault, J. *et al.* Nanoplastics are neither microplastics nor engineered nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 501–507 (2021).
11. Schwaferts, C., Niessner, R., Elsner, M. & Ivleva, N. P. Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. *TrAC*

- 
- Trends in Analytical Chemistry* **112**, 52–65 (2019). doi:10.1016/B978-0-12-817880-5.00002-5.
12. Reynaud, S., Aynard, A., Grassl, B. & Gigault, J. Nanoplastics: From model materials to colloidal fate. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **57**, 101528 (2022).
  13. Cai, H. *et al.* Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges. *Chemical Engineering Journal* **410**, 128208 (2021).
  14. Sander, M., Kohler, H.-P. E. & McNeill, K. Assessing the environmental transformation of nanoplastic through <sup>13</sup>C-labelled polymers. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 301–303 (2019).
  15. Millet, H. *et al.* The nature of plastics and their societal usage. *Plastics and the Environment* **2018**, 1–20 (2018).
  16. OCDE. *Global Plastics Outlook*. (2022). doi:<https://doi.org/https://doi.org/10.1787/de747aef-en>.
  17. Geyer, R. Chapter 2 - Production, use, and fate of synthetic polymers. in *Plastic Waste and Recycling* (ed. Letcher, T. M.) 13–32 (Academic Press, 2020).
  18. Ford, H. V. *et al.* The fundamental links between climate change and marine plastic pollution. *Science of The Total Environment* **806**, 150392 (2022).
  19. Jambeck, J. R. *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **347**, 768–771 (2015).
  20. NOAA. Severe Marine Debris Event Report: Japan Tsunami Marine Debris. Overview and Update to Congress. (2013).
  21. Lebreton, L. C. M. *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. *Nat Commun* **8**, 15611 (2017).
  22. Schmidt, C., Krauth, T. & Wagner, S. Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environmental Science & Technology* **51**, 12246–12253 (2017).
  23. Small, C. & Cohen, J. E. Continental Physiography, Climate, and the Global Distribution of Human Population. *Current Anthropology* **45**, 269–277 (2004).

- 
24. Windsor, F. M. *et al.* A catchment-scale perspective of plastic pollution. *Global Change Biology* **25**, 1207–1221 (2019).
25. Lebreton, L. Industrialised fishing nations largely contribute to floating plastic pollution in the North Pacific subtropical gyre. *Scientific Reports* (2022).
26. Kaandorp, M. L. A., Lobelle, D., Kehl, C., Dijkstra, H. A. & Van Sebille, E. Global mass of buoyant marine plastics dominated by large long-lived debris. *Nat. Geosci.* **16**, 689–694 (2023).
27. Gewert, B., Plassmann, M. M. & MacLeod, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **17**, 1513–1521 (2015).
28. Roweczyk, L. *et al.* Microstructure Characterization of Oceanic Polyethylene Debris. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 4102–4109 (2020).
29. ter Halle, A. *et al.* Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 5668–5675 (2016).
30. Jacquin, J. *et al.* Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”. *Front. Microbiol.* **10**, 865 (2019).
31. Mattern, A. *Size Classification of Plastic Particles.*
32. Carpenter, E. J. & Smith, K. L. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* **175**, 1240–1241 (1972).
33. Wong, C. S., Green, D. R. & Cretney, W. J. Quantitative Tar and Plastic Waste Distributions in the Pacific Ocean. *Nature* **247**, 30–32 (1974).
34. Shim, W. J., Hong, S. H., Jang, M. & Han, G. M. Producing fragmented micro- and nano-sized expanded polystyrene particles with an accelerated mechanical abrasion experiment. in 287 (2014).
35. Hartmann, N. B. *et al.* Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 1039–1047 (2019).
36. ISO/TR 21960: 2020 (en). Plastics—environmental aspects—state of knowledge and methodologies. (2020).

- 
37. Gigault, J. *et al.* Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution* **235**, 1030–1034 (2018).
38. ter Halle, A. *et al.* To what extent are microplastics from the open ocean weathered? *Environmental Pollution* **227**, 167–174 (2017).
39. Woodall, L. C. *et al.* The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. open sci.* **1**, 140317 (2014).
40. Allen, S. *et al.* Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nat. Geosci.* **12**, 339–344 (2019).
41. Eriksen, M. *et al.* A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans—Urgent solutions required. *PLoS ONE* **18**, e0281596 (2023).
42. Phuong, N. N. *et al.* Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution* **211**, 111–123 (2016).
43. Peng, L. *et al.* Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment* **698**, 134254 (2020).
44. Graham, E. R. & Thompson, J. T. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **368**, 22–29 (2009).
45. Taylor, M. L., Gwinnett, C., Robinson, L. F. & Woodall, L. C. Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms. *Sci Rep* **6**, 33997 (2016).
46. Da Silva, P. C. A., Sorrentino, R., Ramos, B. D. S., Senna, A. R. D. & Skinner, L. F. Ingestion of microplastics by benthic marine organisms in the ilha grande bay heritage site on southeastern Brazil. *J. Human Env. Trop. Bays* 1–13 (2021) doi:10.12957/jheotb.2021.60332.
47. Cole, M. *et al.* Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 6646–6655 (2013).
48. Kosore, C. *et al.* Occurrence and ingestion of microplastics by zooplankton in Kenya's marine environment: first documented



- 
- evidence. *African Journal of Marine Science* **40**, 225–234 (2018).
49. Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B. & Janssen, C. R. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution* **199**, 10–17 (2015).
50. Van Cauwenberghe, L. & Janssen, C. R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution* **193**, 65–70 (2014).
51. Lusher, A. L., McHugh, M. & Thompson, R. C. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin* **67**, 94–99 (2013).
52. Carlin, J. *et al.* Microplastic accumulation in the gastrointestinal tracts in birds of prey in central Florida, USA. *Environmental Pollution* **264**, 114633 (2020).
53. Besseling, E. *et al.* Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Marine Pollution Bulletin* **95**, 248–252 (2015).
54. Yong, M. M. H. *et al.* Microplastics in fecal samples of whale sharks (*Rhincodon typus*) and from surface water in the Philippines. *Micropl.&Nanopl.* **1**, 17 (2021).
55. Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V. & Lehtiniemi, M. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution* **185**, 77–83 (2014).
56. Farrell, P. & Nelson, K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution* **177**, 1–3 (2013).
57. Murray, F. & Cowie, P. R. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin* **62**, 1207–1217 (2011).
58. Desforjes, J.-P. W., Galbraith, M. & Ross, P. S. Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch Environ Contam Toxicol* **69**, 320–330 (2015).

- 
59. Ter Halle, A. *et al.* Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 13689–13697 (2017).
60. Materić, D., Holzinger, R. & Niemann, H. Nanoplastics and ultrafine microplastic in the Dutch Wadden Sea – The hidden plastics debris? *Science of The Total Environment* **846**, 157371 (2022).
61. Materić, D. *et al.* Presence of nanoplastics in rural and remote surface waters. *Environ. Res. Lett.* **17**, 054036 (2022).
62. Davranche, M. *et al.* Nanoplastics on the coast exposed to the North Atlantic Gyre: Evidence and traceability. *NanoImpact* **20**, 100262 (2020).
63. Wahl, A. *et al.* Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere* **262**, 127784 (2021).
64. Leslie, H. A. *et al.* Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International* **163**, 107199 (2022).
65. Hernandez, L. M. *et al.* Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 12300–12310 (2019).
66. Busse, K. *et al.* Comment on “Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea”. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 14134–14135 (2020).
67. Shi, C. *et al.* Emergence of nanoplastics in the aquatic environment and possible impacts on aquatic organisms. *Science of The Total Environment* **906**, 167404 (2024).
68. Sullivan, G. L. *et al.* Detection of trace sub-micron (nano) plastics in water samples using pyrolysis-gas chromatography time of flight mass spectrometry (PY-GCToF). *Chemosphere* **249**, 126179 (2020).
69. Xu, Y., Ou, Q., Jiao, M., Liu, G. & Van Der Hoek, J. P. Identification and Quantification of Nanoplastics in Surface Water and Groundwater by Pyrolysis Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **56**, 4988–4997 (2022).
70. Wibuloutai, J., Thongkum, W., Khiewkhern, S., Thunyasirion, C. & Prathumchai, N. Microplastics and nanoplastics contamination in raw and

- 
- treated water. *Water Supply* **23**, 2267–2282 (2023).
71. Zhou, X., Hao, L., Wang, H., Li, Y. & Liu, J. Cloud-Point Extraction Combined with Thermal Degradation for Nanoplastic Analysis Using Pyrolysis Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **91**, 1785–1790 (2019).
72. Triebkorn, R. *et al.* Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **110**, 375–392 (2019).
73. Clark, N. J., Khan, F. R., Mitrano, D. M., Boyle, D. & Thompson, R. C. Demonstrating the translocation of nanoplastics across the fish intestine using palladium-doped polystyrene in a salmon gut-sac. *Environment International* **159**, 106994 (2022).
74. Hansen, U. & Peters, W. Structure and permeability of the peritrophic membranes of some small crustaceans. *Zoologischer Anzeiger* **236**, 103–108 (1998).
75. Vert, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* **84**, 377–410 (2012).
76. Hermabessiere, L. *et al.* Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere* **182**, 781–793 (2017).
77. Wiesinger, H., Wang, Z. & Hellweg, S. Deep Dive into Plastic Monomers, Additives, and Processing Aids. *Environ. Sci. Technol.* **55**, 9339–9351 (2021).
78. Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R. & Mincer, T. J. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* **18**, 139–151 (2020).
79. Prunier, J. *et al.* Trace metals in polyethylene debris from the North Atlantic subtropical gyre. *Environmental Pollution* **245**, 371–379 (2019).
80. El Hadri, H., Gigault, J., Mounicou, S., Grassl, B. & Reynaud, S. Trace element distribution in marine microplastics using laser ablation-ICP-MS. *Marine Pollution Bulletin* **160**, 111716 (2020).
81. Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M. & Tufenkji, N. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced

- 
- Contaminant Transport. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 1704–1724 (2018).
82. Rai, P. K., Sonne, C., Brown, R. J. C., Younis, S. A. & Kim, K.-H. Adsorption of environmental contaminants on micro- and nano-scale plastic polymers and the influence of weathering processes on their adsorptive attributes. *Journal of Hazardous Materials* **427**, 127903 (2022).
83. Zhang, M. & Xu, L. Transport of micro- and nanoplastics in the environment: Trojan-Horse effect for organic contaminants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **52**, 810–846 (2022).
84. Sun, N., Shi, H., Li, X., Gao, C. & Liu, R. Combined toxicity of micro/nanoplastics loaded with environmental pollutants to organisms and cells: Role, effects, and mechanism. *Environment International* **171**, 107711 (2023).
85. Aynard, A. Elaboration de nanoplastiques modèles avec et sans marquage par polymérisation en milieu dispersé et étude de leurs comportements avec des polluants. (Universite de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, 2022).
86. Petersen, Elijah. J. *et al.* Potential Artifacts and Control Experiments in Toxicity Tests of Nanoplastic and Microplastic Particles. *Environ. Sci. Technol.* **56**, 15192–15206 (2022).
87. Pikuda, O., Xu, E. G., Berk, D. & Tufenkji, N. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **6**, 21–25 (2019).
88. Heinlaan, M. *et al.* Hazard evaluation of polystyrene nanoplastic with nine bioassays did not show particle-specific acute toxicity. *Science of The Total Environment* **707**, 136073 (2020).
89. El Hadri, H., Gigault, J., Maxit, B., Grassl, B. & Reynaud, S. Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments. *NanoImpact* **17**, 100206 (2020).
90. Astner, A. F. *et al.* Mechanical formation of micro- and nano-plastic materials for environmental studies in agricultural

- 
- ecosystems. *Science of The Total Environment* **685**, 1097–1106 (2019).
91. Astner, A. F. *et al.* Effects of soil particles and convective transport on dispersion and aggregation of nanoplastics via small-angle neutron scattering (SANS) and ultra SANS (USANS). *PLoS ONE* **15**, e0235893 (2020).
92. Ji, Y. *et al.* Realistic polyethylene terephthalate nanoplastics and the size- and surface coating-dependent toxicological impacts on zebrafish embryos. *Environ. Sci.: Nano* **7**, 2313–2324 (2020).
93. González-Pleiter, M. *et al.* Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. *Environ. Sci.: Nano* **6**, 1382–1392 (2019).
94. Wang, X. *et al.* Photodegradation Elevated the Toxicity of Polystyrene Microplastics to Grouper ( *Epinephelus moara* ) through Disrupting Hepatic Lipid Homeostasis. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 6202–6212 (2020).
95. Xu, E. G. *et al.* Primary and Secondary Plastic Particles Exhibit Limited Acute Toxicity but Chronic Effects on *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 6859–6868 (2020).
96. Baudrimont, M. *et al.* Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environ Sci Pollut Res* **27**, 3746–3755 (2020).
97. Magri, D. *et al.* Laser Ablation as a Versatile Tool To Mimic Polyethylene Terephthalate Nanoplastic Pollutants: Characterization and Toxicology Assessment. *ACS Nano* **12**, 7690–7700 (2018).
98. Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah, J.-A. & Sudesh, K. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials* **12**, 576 (2022).
99. Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C. & Vazquez-Duhalt, R. A novel and simple method for polyethylene terephthalate

- 
- (PET) nanoparticle production. *Environ. Sci.: Nano* **6**, 2031–2036 (2019).
100. Batool, A. & Valiyaveetil, S. Coprecipitation—An Efficient Method for Removal of Polymer Nanoparticles from Water. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **8**, 13481–13487 (2020).
101. Balakrishnan, G., Déniel, M., Nicolai, T., Chassenieux, C. & Lagarde, F. Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. *Environ. Sci.: Nano* **6**, 315–324 (2019).
102. Tanaka, K. *et al.* Size-Controlled Preparation of Polyethylene Nanoplastic Particles by Nanoprecipitation and Insights into the Underlying Mechanisms. *ACS Omega* **8**, 14470–14477 (2023).
103. Merdy, P. *et al.* Nanoplastic production procedure for scientific purposes: PP, PVC, PE-LD, PE-HD, and PS. *Heliyon* **9**, e18387 (2023).
104. *Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation.* (Wiley, 2013). doi:10.1002/9781118638521.
105. Kihara, S. *et al.* Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona. *Bioconjugate Chem.* **30**, 1067–1076 (2019).
106. Wan, T. *et al.* A spectroscopic and theoretical investigation of interaction mechanisms of tetracycline and polystyrene nanospheres under different conditions. *Environmental Pollution* **249**, 398–405 (2019).
107. Pessoni, L. *et al.* Soap- and metal-free polystyrene latex particles as a nanoplastic model. *Environ. Sci.: Nano* **6**, 2253–2258 (2019).
108. Enyoh, C. E. *et al.* New Analytical Approaches for Effective Quantification and Identification of Nanoplastics in Environmental Samples. *Processes* **9**, 2086 (2021).
109. Ivleva, N. P. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chem. Rev.* **121**, 11886–11936 (2021).
110. Velimirovic, M., Tirez, K., Voorspoels, S. & Vanhaecke, F. Recent developments in

- 
- mass spectrometry for the characterization of micro- and nanoscale plastic debris in the environment. *Anal Bioanal Chem* **413**, 7–15 (2021).
111. Caldwell, J. *et al.* The micro-, submicron-, and nanoplastic hunt: A review of detection methods for plastic particles. *Chemosphere* **293**, 133514 (2022).
112. Fang, C., Luo, Y. & Naidu, R. Microplastics and nanoplastics analysis: Options, imaging, advancements and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **166**, 117158 (2023).
113. Akoueson, F. *et al.* Identification and quantification of plastic additives using pyrolysis-GC/MS: A review. *Science of The Total Environment* **773**, 145073 (2021).
114. Akoueson, F. *et al.* Additives in polypropylene and polylactic acid food packaging: Chemical analysis and bioassays provide complementary tools for risk assessment. *Science of The Total Environment* **857**, 159318 (2023).
115. da Costa, J. P., Avellan, A., Mouneyrac, C., Duarte, A. & Rocha-Santos, T. Plastic additives and microplastics as emerging contaminants: Mechanisms and analytical assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **158**, 116898 (2023).
116. Gigault, J., El Hadri, H., Reynaud, S., Deniau, E. & Grassl, B. Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Anal Bioanal Chem* **409**, 6761–6769 (2017).
117. Schwaferts, C. *et al.* Nanoplastic Analysis by Online Coupling of Raman Microscopy and Field-Flow Fractionation Enabled by Optical Tweezers. *Anal. Chem.* **92**, 5813–5820 (2020).
118. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).
119. Geißler, D., Nirmalanathan-Budau, N., Scholtz, L., Tavernaro, I. & Resch-Genger, U. Analyzing the surface of functional nanomaterials—how to quantify the total and derivatizable number of functional groups and ligands. *Microchim Acta* **188**, 321 (2021).

- 
120. Enfrin, M. *et al.* Release of hazardous nanoplastic contaminants due to microplastics fragmentation under shear stress forces. *Journal of Hazardous Materials* **384**, 121393 (2020).
121. Lambert, S. & Wagner, M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* **145**, 265–268 (2016).
122. Lambert, S. & Wagner, M. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere* **161**, 510–517 (2016).
123. Sobhani, Z. *et al.* Identification and visualisation of microplastics/nanoplastics by Raman imaging (i): Down to 100 nm. *Water Research* **174**, 115658 (2020).
124. Zhang, W., Dong, Z., Zhu, L., Hou, Y. & Qiu, Y. Direct Observation of the Release of Nanoplastics from Commercially Recycled Plastics with Correlative Raman Imaging and Scanning Electron Microscopy. *ACS Nano* **14**, 7920–7926 (2020).
125. Seeley, M. E. & Lynch, J. M. Previous successes and untapped potential of pyrolysis–GC/MS for the analysis of plastic pollution. *Anal Bioanal Chem* (2023) doi:10.1007/s00216-023-04671-1.
126. Bouzid, N. *et al.* Quantification of Microplastics by Pyrolysis Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Sediments: Challenges and Implications. *Microplastics* **1**, 229–239 (2022).
127. Le Juge, C., Grassl, B., Allan, I. J. & Gigault, J. Identification of polystyrene nanoplastics from natural organic matter in complex environmental matrices by pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2023) doi:10.1007/s00216-023-04609-7.
128. Chatterjee, S., Krolis, E., Molenaar, R., Claessens, M. M. A. E. & Blum, C. Nile Red staining for nanoplastic quantification: Overcoming the challenge of false positive counts due to fluorescent aggregates. *Environmental Challenges* **13**, 100744 (2023).
129. Jiménez-Lamana, J. *et al.* A Novel Strategy for the Detection and Quantification of Nanoplastics by Single



- 
- Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). *Anal. Chem.* **92**, 11664–11672 (2020).
130. Crawford, L., Higgins, J. & Putnam, D. A Simple and Sensitive Method to Quantify Biodegradable Nanoparticle Biodistribution using Europium Chelates. *Sci Rep* **5**, 13177 (2015).
131. Booth, A. M., Hansen, B. H., Frenzel, M., Johnsen, H. & Altin, D. Uptake and toxicity of methacrylate-based nanoplastic particles in aquatic organisms: Ecotoxicity and uptake of nanoplastic particles. *Environ Toxicol Chem* **35**, 1641–1649 (2016).
132. Murray, R. A. *et al.* Fluorescently labelled nanomaterials in nanosafety research: Practical advice to avoid artefacts and trace unbound dye. *NanoImpact* **9**, 102–113 (2018).
133. Catarino, A. I., Frutos, A. & Henry, T. B. Use of fluorescent-labelled nanoplastics (NPs) to demonstrate NP absorption is inconclusive without adequate controls. *Science of The Total Environment* **670**, 915–920 (2019).
134. Schür, C. *et al.* When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environ Toxicol Chem* **38**, 1495–1503 (2019).
135. Thielbeer, F., Chankeshwara, S. V. & Bradley, M. Polymerizable Fluorescein Derivatives: Synthesis of Fluorescent Particles and Their Cellular Uptake. *Biomacromolecules* **12**, 4386–4391 (2011).
136. Reisch, A. & Klymchenko, A. S. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small* **12**, 1968–1992 (2016).
137. Mitrano, D. M. *et al.* Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 362–368 (2019).
138. Tamayo-Belda, M. *et al.* Tracking nanoplastics in freshwater microcosms and their impacts to aquatic organisms. *Journal of Hazardous Materials* **445**, 130625 (2023).
139. Vicentini, D. S. *et al.* Toxicological Evaluation and Quantification of

- 
- Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods. *Environ Toxicol Chem* **38**, 2101–2110 (2019).
140. Zhang, L. *et al.* A quantitative study of nanoplastics within cells using magnetic resonance imaging. *Science of The Total Environment* **886**, 164033 (2023).
141. Rauschendorfer, R. J. *et al.* Development and Application of Nanoparticle-Nanopolymer Composite Spheres for the Study of Environmental Processes. *Front. Toxicol.* **3**, 752296 (2021).
142. Zhang, P. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering labeled nanoplastic models for reliable bio-nano interaction investigations. *Journal of Hazardous Materials* **425**, 127959 (2022).
143. Du, H. *et al.* Quantitative assessment of in vivo distribution of nanoplastics in bivalve *Ruditapes philippinarum* using reliable SERS tag-labeled nanoplastic models. *Nanoscale* **14**, 7807–7816 (2022).
144. Wen, S. *et al.* Advances in highly doped upconversion nanoparticles. *Nat Commun* **9**, 2415 (2018).
145. Huhtinen, P. *et al.* Preparation, characterisation and application of europium(III) chelate-dyed polystyrene-acrylic acid nanoparticle labels. *Analytica Chimica Acta* **630**, 211–216 (2008).
146. Yakovenko, N. *et al.* Top-down synthesis of luminescent microplastics and nanoplastics by incorporation of upconverting nanoparticles for environmental assessment. *Environ. Sci.: Nano* **9**, 2453–2463 (2022).
147. Abdolapur Monikh, F. *et al.* Quantifying the trophic transfer of sub-micron plastics in an assembled food chain. *Nano Today* **46**, 101611 (2022).
148. Luo, Y. *et al.* Quantitative tracing of uptake and transport of submicrometre plastics in crop plants using lanthanide chelates as a dual-functional tracer. *Nat. Nanotechnol.* **17**, 424–431 (2022).
149. Lanctôt, C. M. *et al.* Application of nuclear techniques to environmental plastics research. *Journal of*

- 
- Environmental Radioactivity* **192**, 368–375 (2018).
150. Dai, W. *et al.* Radiolabeling of Nanomaterials: Advantages and Challenges. *Front. Toxicol.* **3**, 753316 (2021).
151. Al-Sid-Cheikh, M. *et al.* Synthesis of <sup>14</sup>C-labelled polystyrene nanoplastics for environmental studies. *Commun Mater* **1**, 97 (2020).
152. Al-Sid-Cheikh, M. *et al.* Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 14480–14486 (2018).
153. Soubaneh, Y. D. *et al.* Depuration of ingested <sup>14</sup>C-labelled polystyrene nanospheres in the Atlantic scallop (*Placopecten magellanicus*). *Marine Pollution Bulletin* **196**, 115575 (2023).
154. Murazzi, M. *et al.* Can forest trees take up and transport nanoplastics? *iForest* **15**, 128–132 (2022).
155. Schür, C. *et al.* When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environ Toxicol Chem* **38**, 1495–1503 (2019).
156. Sander, M., Kohler, H.-P. E. & McNeill, K. Assessing the environmental transformation of nanoplastic through <sup>13</sup>C-labelled polymers. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 300–303 (2019).
157. Odian, G. & Odian, G. G. *Principles of Polymerization.* (Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2004).
158. Polpanich, D., Tangboriboonrat, P. & Elaissari, A. The effect of acrylic acid amount on the colloidal properties of polystyrene latex. *Colloid Polym Sci* **284**, 183–191 (2005).
159. Hennig, A. *et al.* Simple Colorimetric Method for Quantification of Surface Carboxy Groups on Polymer Particles. *Anal. Chem.* **83**, 4970–4974 (2011).
160. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
161. Krumbiegel, P. Large deuterium isotope effects and their use: a historical review. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **47**, 1–17 (2011).

- 
162. Li, L., Jakowski, J., Do, C. & Hong, K. Deuteration and Polymers: Rich History with Great Potential. *Macromolecules* **54**, 3555–3584 (2021).
163. White, R. P., Lipson, J. E. G. & Higgins, J. S. Effect of Deuterium Substitution on the Physical Properties of Polymer Melts and Blends. *Macromolecules* **43**, 4287–4293 (2010).
164. Gómez-Gallego, M. & Sierra, M. A. Kinetic Isotope Effects in the Study of Organometallic Reaction Mechanisms. *Chem. Rev.* **111**, 4857–4963 (2011).
165. Pryor, W. A., Henderson, R. W., Patsiga, R. A. & Carroll, N. Hydrogen Secondary Isotope Effects on the Radical Polymerization of Styrene <sup>1,2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1199–1205 (1966).
166. Clouet, G. & Chaffanjon, P. Rate Constants in the Free-Radical Polymerization of Perdeuterated Styrene. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **27**, 193–212 (1990).
167. Wright, T. G. & Pasch, H. A simple route to deuterated polystyrene block copolymers by reverse iodine transfer polymerisation. *Polym. Chem.* **6**, 3236–3244 (2015).
168. Bruyn, H. D., Gilbert, R. G., White, J. W. & Schulz, J. C. Characterization of electrosterically stabilized polystyrene latex; implications for radical entry kinetics. *Polymer* **44**, 4411–4420 (2003).
169. Lahmar, H., Badr, I., Kaewsaneha, C., Elaissari, A. & Saidi-Besbes, S. 1,2,3-triazole functionalized polystyrene and perdeuterated polystyrene chelating latexes. *Colloid Polym Sci* **297**, 1119–1131 (2019).
170. Kopecky, K. R. & Evani, S. Mechanism of initiation in the thermal polymerization of styrene. Kinetic deuterium isotope effects in the initiation step of the thermal polymerization of some deuterated styrenes. *Can. J. Chem.* **47**, 4049–4058 (1969).
171. Bates, F. S. & Wignall, G. D. Isotope-Induced Quantum-Phase Transitions in the Liquid State. *Phys. Rev. Lett.* **57**, 1429–1432 (1986).
172. Tsuge, S., Ohtani, H. & Watanabe, C. *Pyrolysis-GC/MS Data Book of Synthetic Polymers: Pyrograms, Thermograms and*

- 
- MS of Pyrolyzates. (Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2011).
173. Pyrolysis-GC/MS. *Frontier Lab* <https://www.frontier-lab.com/technical-information/methodology/part4/>.
174. Picó, Y. & Barceló, D. Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry in environmental analysis: Focus on organic matter and microplastics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **130**, 115964 (2020).
175. Fischer, M. & Scholz-Böttcher, B. M. Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by Pyrolysis-Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 5052–5060 (2017).
176. Unice, K. M., Kreider, M. L. & Panko, J. M. Use of a Deuterated Internal Standard with Pyrolysis-GC/MS Dimeric Marker Analysis to Quantify Tire Tread Particles in the Environment. *IJERPH* **9**, 4033–4055 (2012).
177. *Analytical Pyrolysis Handbook: Third Edition*. (CRC Press, Third edition. | Boca Raton : CRC Press, 2021. | Revised edition of: Applied pyrolysis handbook / edited by Thomas P. Wampler. 2nd ed. c2007., 2021). doi:10.1201/9780429201202.
178. Steinmetz, Z., Kintzi, A., Muñoz, K. & Schaumann, G. E. *A Simple Method for the Selective Quantification of Polyethylene, Polypropylene, and Polystyrene Plastic Debris in Soil by Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. <https://peerj.com/preprints/27989v2> (2019) doi:10.7287/peerj.preprints.27989v2.
179. Albignac, M., Ghiglione, J. F., Labruno, C. & Ter Halle, A. Determination of the microplastic content in Mediterranean benthic macrofauna by pyrolysis-gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Marine Pollution Bulletin* **181**, 113882 (2022).
180. Arthur Stankiewicz, B. *et al.* Recognition of Chitin and Proteins in Invertebrate Cuticles Using Analytical Pyrolysis/Gas Chromatography and Pyrolysis/Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1747–1757 (1996).

- 
181. Tsuge, S. & Matsubara, H. High-resolution pyrolysis-gas chromatography of proteins and related materials. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **8**, 49–64 (1985).
182. Dehaut, A., Hermabessiere, L. & Duflos, G. Microplastics Detection Using Pyrolysis-GC/MS-Based Methods. in *Handbook of Microplastics in the Environment* (eds. Rocha-Santos, T., Costa, M. & Mouneyrac, C.) 1–35 (Springer International Publishing, Cham, 2020). doi:10.1007/978-3-030-10618-8\_27-1.
183. Lauschke, T., Dierkes, G., Schweyen, P. & Ternes, T. A. Evaluation of poly(styrene-d5) and poly(4-fluorostyrene) as internal standards for microplastics quantification by thermoanalytical methods. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **159**, 105310 (2021).
184. Korenaga, T., Suzuki, Y. & Chikaraishi, Y. Biochemical Stable Isotope Analysis in Food Authenticity. in *Engineering Tools in the Beverage Industry* 209–227 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-815258-4.00007-X.
185. Ogawa, N. O., Nagata, T., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. Ultra-sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses.
186. Chartier, F., Isnard, H. & Nonell, A. Analyses isotopiques par spectrométrie de masse-Méthodes et applications. *Techniques de l'Ingénieur* **3740**, (2014).
187. Coplen, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results: Guidelines and recommended terms for expressing stable isotope results. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2538–2560 (2011).
188. Flenker, U. Isotope ratio mass spectrometry - history and terminology in brief: IRMS - history and terminology. *Drug Test. Analysis* **4**, 893–896 (2012).
189. Laeter, J. R. de *et al.* Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **75**, 683–800 (2003).
190. Berto, D. *et al.* Elemental Analyzer/Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA/IRMS) as a Tool to

- 
- Characterize Plastic Polymers in a Marine Environment. in *Plastics in the Environment* (ed. Gomiero, A.) (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.81485.
191. Suzuki, Y., Akamatsu, F., Nakashita, R. & Korenaga, T. A Novel Method to Discriminate between Plant- and Petroleum-derived Plastics by Stable Carbon Isotope Analysis. *Chem. Lett.* **39**, 998–999 (2010).
192. Coplen, T. B. & Shrestha, Y. Isotope-abundance variations and atomic weights of selected elements: 2016 (IUPAC Technical Report).
193. Berto, D. *et al.* Preliminary study to characterize plastic polymers using elemental analyser/isotope ratio mass spectrometry (EA/IRMS). *Chemosphere* **176**, 47–56 (2017).
194. Birch, Q. T., Potter, P. M., Pinto, P. X., Dionysiou, D. D. & Al-Abed, S. R. Isotope ratio mass spectrometry and spectroscopic techniques for microplastics characterization. *Talanta* **224**, 121743 (2021).
195. Okoffo, E. D. *et al.* Identification and quantification of selected plastics in biosolids by pressurized liquid extraction combined with double-shot pyrolysis gas chromatography–mass spectrometry. *Science of The Total Environment* **715**, 136924 (2020).
196. Wells, G., Prest, H., William Russ IV, C. & Agilent Technologies, Inc. Signal, Noise, and Detection Limits in Mass Spectrometry. *Agilent Technologies Technical Note* (2021).
197. Official Journal of the European Communities. *Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results.* 36 (2002).
198. U.S. EPA. *U.S. EPA - Title 40: Protection of Environment; Part 136 –Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Appendix B to Part 136 – Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit – Revision 1.11.* (2011).
199. Gonfiantini, R. Standards for stable isotope measurements in natural

- 
- compounds. *Nature* **271**, 534–536 (1978).
200. Schiegl, W. E. & Vogel, J. C. Deuterium content of organic matter. *Earth and Planetary Science Letters* **7**, 307–313 (1970).
201. Ebert, D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. (National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 2005).
202. Burns, C. W. The relationship between body size of filter-feeding cladocera and the maximum size of particle ingested: maximum particle size ingested by cladocera. *Limnol. Oceanogr.* **13**, 675–678 (1968).
203. Turko, P. W. *Ecological Differentiation in a Hybridizing Cryptic Species Complex*. (Queen’s University Kingston, Ontario, Canada, 2011).
204. Liu, Z., Malinowski, C. R. & Sepúlveda, M. S. Emerging trends in nanoparticle toxicity and the significance of using *Daphnia* as a model organism. *Chemosphere* **291**, 132941 (2022).
205. OCDE. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. (2004).
206. OCDE. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. (2012).
207. Testing, A. S. for & Materials. Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity tests with *Daphnia magna*. *Annual Book of ASTM Standards* **1104**, 1–17 (1988).
208. Ruck, J. G., Martin, M. & Mabon, M. Evaluation of Toxkits as methods for monitoring water quality in New Zealand. in *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* (eds. Persoone, G., Janssen, C. & De Coen, W.) 103–119 (Springer US, Boston, MA, 2000). doi:10.1007/978-1-4615-4289-6\_9.
209. Lee, B.-Y. *et al.* The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* **210**, 69–84 (2019).
210. Nourisson, M. & Thiéry, A. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises. - 9. Crustacés Branchiopodes



- (Anostracés, Notostracés, Conchostracés). *linly* **57**, 75–95 (1988).
211. Gajardo, G., Abatzopoulos, T. J., Kappas, I. & Beardmore, J. A. Evolution and Speciation. in *Artemia: Basic and Applied Biology* (eds. Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S. & Sorgeloos, P.) 225–250 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2002). doi:10.1007/978-94-017-0791-6\_5.
212. Scalone, R. & Rabet, N. Presence of *Artemia franciscana* (Branchiopoda, Anostraca) in France: morphological, genetic, and biometric evidence. *AI* **8**, 67–76 (2013).
213. Brisset, P. Elevage et utilisation en aquaculture de l'*Artemia*. (Université des sciences et techniques de Lille, 1984).
214. Dockery, M. & Tomkins, S. Brine shrimp ecology. *British Ecological Society* (2000).
215. Johari, S. A. *et al.* Introducing a new standardized nanomaterial environmental toxicity screening testing procedure, ISO/TS 20787: aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater Lakes using *Artemia sp.* nauplii. *Toxicology Mechanisms and Methods* **29**, 95–109 (2019).
216. Dhont, J. & Sorgeloos, P. Applications of *Artemia*. in *Artemia: Basic and Applied Biology* (eds. Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S. & Sorgeloos, P.) 251–277 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2002). doi:10.1007/978-94-017-0791-6\_6.
217. Jemec Kokalj, A., Heinlaan, M., Novak, S., Drobne, D. & Kühnel, D. Defining Quality Criteria for Nanoplastic Hazard Evaluation: The Case of Polystyrene Nanoplastics and Aquatic Invertebrate *Daphnia* spp. *Nanomaterials* **13**, 536 (2023).
218. Reynolds, A., Giltrap, M. & Chambers, G. Evaluation of non-invasive toxicological analysis of nano-polystyrene in relative *in vivo* conditions to *D. magna*. *Environ. Sci.: Nano* **6**, 2832–2849 (2019).
219. Rosenkranz, P., Chaudhry, Q., Stone, V. & Fernandes, T. F. A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* **28**, 2142 (2009).

- 
220. Rist, S., Baun, A. & Hartmann, N. B. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution* **228**, 398–407 (2017).
221. Zhang, Y.-H. *et al.* *Daphnia magna* uptake and excretion of luminescence-labelled polystyrene nanoparticle as visualized by high sensitivity real-time optical imaging. *Chemosphere* **326**, 138341 (2023).
222. Wang, M. & Wang, W.-X. Accumulation Kinetics and Gut Microenvironment Responses to Environmentally Relevant Doses of Micro/Nanoplastics by Zooplankton *Daphnia Magna*. *Environ. Sci. Technol.* **57**, 5611–5620 (2023).
223. Saavedra, J., Stoll, S. & Slaveykova, V. I. Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. *Environmental Pollution* **252**, 715–722 (2019).
224. Kaur, J. *et al.* Label-free detection of polystyrene nanoparticles in *Daphnia magna* using Raman confocal mapping. *Nanoscale Adv.* **5**, 3453–3462 (2023).
225. Brun, N. R., Beenakker, M. M. T., Hunting, E. R., Ebert, D. & Vijver, M. G. Brood pouch-mediated polystyrene nanoparticle uptake during *Daphnia magna* embryogenesis. *Nanotoxicology* **11**, 1059–1069 (2017).
226. Chae, Y., Kim, D., Kim, S. W. & An, Y.-J. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Sci Rep* **8**, 284 (2018).
227. Wang, M. & Wang, W.-X. Selective ingestion and response by *Daphnia magna* to environmental challenges of microplastics. *Journal of Hazardous Materials* **458**, 131864 (2023).
228. Nasser, F. & Lynch, I. Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *Journal of Proteomics* **137**, 45–51 (2016).
229. Bergami, E. *et al.* Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **123**, 18–25 (2016).

- 
230. Bergami, E. *et al.* Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology* **189**, 159–169 (2017).
231. Gambardella, C. *et al.* Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**, 250–257 (2017).
232. Sendra, M., Sparaventi, E., Blasco, J., Moreno-Garrido, I. & Araujo, C. V. M. Ingestion and bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effects on the microalgal feeding of *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **188**, 109853 (2020).
233. Machado, A. J. T. *et al.* Single and combined toxicity of amino-functionalized polystyrene nanoparticles with potassium dichromate and copper sulfate on brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Environ Sci Pollut Res* **28**, 45317–45334 (2021).
234. Kim, L., Cui, R., Kwak, J. I. & An, Y.-J. Sub-acute exposure to nanoplastics via two-chain trophic transfer: From brine shrimp *Artemia franciscana* to small yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Marine Pollution Bulletin* **175**, 113314 (2022).
235. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
236. Leonard, E. M. & Wood, C. M. Acute toxicity, critical body residues, Michaelis–Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **158**, 10–21 (2013).
237. Albignac, M. *et al.* Assessment of nanoplastic extraction from natural samples for quantification purposes. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* **20**, 100862 (2023).

- 
238. Besseling, E., Wang, B., Lürling, M. & Koelmans, A. A. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 12336–12343 (2014).
239. Wu, J., Jiang, R., Lin, W. & Ouyang, G. Effect of salinity and humic acid on the aggregation and toxicity of polystyrene nanoplastics with different functional groups and charges. *Environmental Pollution* **245**, 836–843 (2019).
240. Frankel, R., Ekvall, M. T., Kelpsiene, E., Hansson, L.-A. & Cedervall, T. Controlled protein mediated aggregation of polystyrene nanoplastics does not reduce toxicity towards *Daphnia magna*. *Environ. Sci.: Nano* **7**, 1518–1524 (2020).
241. Vaz, V. P., Nogueira, D. J., Vicentini, D. S. & Matias, W. G. Can the sonication of polystyrene nanoparticles alter the acute toxicity and swimming behavior results for *Daphnia magna*? *Environ Sci Pollut Res* **28**, 14192–14198 (2021).
242. Verdú, I. *et al.* Polystyrene nanoplastics and wastewater displayed antagonistic toxic effects due to the sorption of wastewater micropollutants. *Science of The Total Environment* **819**, 153063 (2022).
243. Davis, A., Nasser, F., Lead, J. R. & Shi, Z. Development and application of a ratiometric nanosensor for measuring pH inside the gastrointestinal tract of zooplankton. *Environ. Sci.: Nano* **7**, 1652–1660 (2020).
244. Wassenaar, P. N. H., Verbruggen, E. M. J., Cieraad, E., Peijnenburg, W. J. G. M. & Vijver, M. G. Variability in fish bioconcentration factors: Influences of study design and consequences for regulation. *Chemosphere* **239**, 124731 (2020).
245. Gillis, P. L., Chow-Fraser, P., Ranville, J. F., Ross, P. E. & Wood, C. M. *Daphnia* need to be gut-cleared too: the effect of exposure to and ingestion of metal-contaminated sediment on the gut-clearance patterns of *D. magna*. *Aquatic Toxicology* **71**, 143–154 (2005).
246. Kennedy, A. J. *et al.* Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* **27**, 1932 (2008).

- 
247. Petersen, E. J., Akkanen, J., Kukkonen, J. V. K. & Weber, W. J. Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 2969–2975 (2009).
248. Skjolding, L. M. *et al.* Uptake and depuration of gold nanoparticles in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* **23**, 1172–1183 (2014).
249. Abatzopoulos, T. J. *Artemia: Basic and Applied Biology*. (Springer, Dordrecht, 2011).
250. Houghton, I. A., Koseff, J. R., Monismith, S. G. & Dabiri, J. O. Vertically migrating swimmers generate aggregation-scale eddies in a stratified column. *Nature* **556**, 497–500 (2018).
251. Laborda, F., Trujillo, C. & Lobinski, R. Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13 isotope. *Talanta* **221**, 121486 (2021).
252. Zumstein, M. T. *et al.* Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. *Sci. Adv.* **4**, eaas9024 (2018).
253. Clode, P. L., Stern, R. A. & Marshall, A. T. Subcellular imaging of isotopically labeled carbon compounds in a biological sample by ion microprobe (NanoSIMS). *Microsc. Res. Tech.* **70**, 220–229 (2007).
254. Chen Ming Low, J., Wright, A. J., Hesse, F., Cao, J. & Brindle, K. M. Metabolic imaging with deuterium labeled substrates. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **134–135**, 39–51 (2023).
255. Von Morze, C. *et al.* Comparison of hyperpolarized <sup>13</sup>C and non-hyperpolarized deuterium MRI approaches for imaging cerebral glucose metabolism at 4.7 T. *Magnetic Resonance in Med* **85**, 1795–1804 (2021).
256. Lv, X. *et al.* Imaging Sequences for Hyperpolarized Solids. *Molecules* **26**, 133 (2020).
257. Egoshi, S., Dodo, K. & Sodeoka, M. Deuterium Raman imaging for lipid analysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **70**, 102181 (2022).

---

258. Shi, L. & Jang, H. Perspectives on SRS

Imaging of Nanoparticles. *Acc. Mater.*

*Res.* **4**, 726–728 (2023).



## Abstract

### **Stable isotope-labeled nanoplastic model materials: synthesis, quantification in complex organic matrices and accumulation in *Daphnia magna* and *Artemia sp.***

The quantification of the smallest plastic debris, nanoplastics, within complex matrices remains a challenge for the scientific community due to their nature and size. Nanoplastic model materials, which are used in laboratory studies, can be labeled to facilitate their detection. Among the various labeling techniques, isotopic labeling, with stable isotopes, appears to be the best solution to closely approximate natural nanoplastics, with no risk of leaching, contrary to other types of labeling. Currently, the majority of model nanoplastics, are synthesized with surfactants or other additives that can alter the physicochemical properties and toxicity of nanoplastics.

In this context, the objective of this PhD thesis was to synthesize, without surfactants or additives, deuterium-labeled or  $^{13}\text{C}$ -labeled nanoplastics, to develop analytical methods for their quantification in the presence of a complex matrix, in order to study the accumulation of nanoplastics and their toxicity towards two planktonic crustaceans.

First, surfactant-free polymerization was used, with labeled styrene, to synthesize deuterium-labeled or  $^{13}\text{C}$ -labeled nanoplastic model materials. This method enables the production of spherical, monodisperse nanoplastics with negatively charged surface carboxyl groups, mimicking surface oxidation of aged plastics. Once the nanoplastics were synthesized and characterized, two analytical methods were developed using two different techniques: the pyrolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry (Py-GC/MS) and elemental analysis coupled with stable isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS). Isotopically labeled nanoplastics and the associated quantification methods were then used for two ecotoxicological studies. In the first one, *Daphnia magna* were exposed to deuterium-labeled nanoplastics and analyzed by Py-GC/MS. If no significant mortality was observed, the quantification results, on the other hand, demonstrated high accumulation of nanoplastics, dependent on the concentration, with a maximum accumulation capacity at the highest concentrations. In the depuration study, the presence of food proved to be an important factor, enabling much more effective depuration. In the second study, *Artemia sp.* were exposed to  $^{13}\text{C}$ -labeled nanoplastics and analyzed using EA-IRMS and Py-GC/MS. Similar to the daphnids, no relationship between exposure concentration and mortality was observed. Accumulation of nanoplastics was also measured in *Artemia sp.*, the accumulation levels being directly related to the exposure concentration, the exposure time, and the organism's gender (higher accumulation in females). Open-loop depuration study demonstrated a significant decrease in the mass of accumulated nanoplastics, with levels falling below the method's detection limit after a few days of depuration. Both of these studies demonstrated the potential of isotopic labeling enabling the quantification of nanoplastics in complex matrices for ecotoxicological studies conducted under realistic conditions.









**Nanoplastiques modèles marqués aux isotopes stables :  
synthèse, quantification dans des matrices organiques complexes  
et accumulation par *Daphnia magna* et *Artemia sp.***

Le suivi des plus petits débris plastiques, les nanoplastiques, à faible teneur dans des matrices complexes reste aujourd'hui un enjeu de recherche et un défi majeur en raison de leur nature et de leur taille. Lors d'études en laboratoire, l'utilisation de nanoplastiques modèles permet d'avoir recours à des techniques de marquage qui facilitent leur détection. Parmi les différents marqueurs possibles, le marquage à l'aide d'isotopes stables permet de s'approcher au plus près du nanoplastique naturel, sans risque de désorption du marqueur comme pour d'autres types de marquages. Actuellement, la majorité des nanoplastiques modèles sont synthétisés avec des tensioactifs ou d'autres additifs qui peuvent modifier les propriétés physico-chimiques des nanoplastiques et leur toxicité. Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse était tout d'abord d'élaborer, sans tensioactifs ou autres additifs, des nanoplastiques marqués avec des isotopes stables, puis de développer les méthodes analytiques permettant leur quantification en présence de matrice complexe, afin d'étudier leur accumulation et leur toxicité vis à vis de deux crustacés planctoniques. Dans un premier temps, des nanoplastiques modèles de polystyrène, marqués au deutérium ou au carbone  $^{13}\text{C}$ , ont été synthétisés par polymérisation sans tensioactifs. Cette méthode permet d'obtenir des nanoplastiques sphériques, monodisperses et chargés négativement par des groupements carboxyles de surface, imitant l'oxydation de surface des plastiques vieillis dans la nature. Une fois les nanoplastiques synthétisés et caractérisés, deux méthodes analytiques de quantification ont été développées à l'aide de deux techniques différentes : la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Py-GC/MS) et l'analyse élémentaire couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique (EA-IRMS). Les nanoplastiques marqués à l'isotopie et les méthodes de quantification associées ont ensuite été utilisés pour deux études écotoxicologiques. Dans la première, des *Daphnia magna* ont été exposées à différentes concentrations de nanoplastiques deutérés et analysées par Py-GC/MS. Si aucune mortalité significative n'a été observée, les résultats de quantification ont en revanche montré une forte accumulation des nanoplastiques, dépendante de la concentration, avec une capacité maximale d'accumulation, aux concentrations les plus hautes. Lors de l'étude de la dépuración, l'apport de nourriture s'est révélé être un aspect important permettant une bien meilleure dépuración. Dans la deuxième étude, les *Artemia sp.* ont été exposées à des nanoplastiques marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  et analysées par EA-IRMS et Py-GC/MS. Comme pour les daphnies, aucune relation entre la concentration d'exposition et la mortalité n'a été relevée. L'accumulation des nanoplastiques a également été mesurée chez les artémias, directement dépendante de la concentration d'exposition, du temps d'exposition et du genre de l'organisme (accumulation plus forte chez les femelles). L'étude de la dépuración en circuit ouvert a montré une nette diminution de la masse de nanoplastiques accumulés avec, après quelques jours de dépuración, des niveaux inférieurs à la limite de détection de la méthode. Ces travaux ont montré tout le potentiel du marquage isotopique permettant la quantification de nanoplastiques en milieu complexe pour des écotoxicologiques réalisées en conditions réalistes.