



Évaluation de la contamination environnementale par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, les nanoparticules métalliques et les microplastiques

Aurore Zalouk-Vergnoux

► To cite this version:

Aurore Zalouk-Vergnoux. Évaluation de la contamination environnementale par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, les nanoparticules métalliques et les microplastiques. Sciences de l'environnement. Université de Nantes, 2019. tel-04115066

HAL Id: tel-04115066

<https://hal.science/tel-04115066>

Submitted on 2 Jun 2023

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

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

HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Ecotoxicologie*

Par

Dr Aurore ZALOUK-VERGNOUX

**Évaluation de la contamination environnementale
par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques,
les nanoparticules métalliques et les microplastiques**

HDR présentée et soutenue à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, le 19 juillet 2019
Unité de recherche : EA 2160 MMS – Mer, Molécules, Santé

Composition du Jury :

Rapporteurs :	Jérôme CACHOT , Professeur, Université de Bordeaux Raphaël DELÉPÉE , Professeur, Université Caen Normandie Gérald THOUAND , Professeur, Université de Nantes
Examineurs :	Farida AKCHA , Chercheure HDR, IFREMER Nantes Laurence POIRIER , Maître de conférences, Université de Nantes
Président :	Pierre DOUMENQ , Professeur, Université d'Aix-Marseille

À mes aïeux,
À mes grands-parents,
À mes parents,
À mon mari,
À mes enfants

« Nous n'héritons pas de la terre de nos parents,
nous l'empruntons à nos enfants. »
Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Je présente mes remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce dossier pour leur disponibilité, leur temps et leur expertise. Je remercie les rapporteurs : le Pr Jérôme Cachot de l'Université de Bordeaux, le Pr Raphaël Delépée de l'Université de Caen Normandie et le Pr Gérald Thouand de l'Université de Nantes. Un grand merci également aux examinateurs : le Dr Farida Akcha de l'IFREMER de Nantes, le Pr Pierre Doumenq de l'Université d'Aix-Marseille et le Dr Laurence Poirier de l'Université de Nantes.

Je tiens précisément à remercier le Pr Pierre Doumenq, « M. Doumenq », qui a accepté d'être le garant de ce dossier de demande d'HDR. Merci pour votre temps, votre aide, votre perspicacité, votre humour qui sont appréciables dans le travail ! Voilà maintenant plus de 14 ans que j'ai croisé votre chemin. Sans votre soutien toutes ces années, je n'en serais pas arrivée là.

Je souhaite également remercier vivement ma plus proche collègue depuis plus de 9 ans, le Dr. Laurence Poirier, qui est à présent ma chef, mais aussi mon amie et avec qui nous traversons les aventures au laboratoire. Je suis très heureuse que nous partagions nos bureaux. C'est particulièrement agréable de pouvoir partager avec toi des discussions scientifiques, techniques, administratives... mais aussi familiales, personnelles... Tu es un exemple pour moi de force de travail, implication et loyauté.

Un grand merci à tous les autres membres du département de Chimie Générale, Minérale et Analytique de la Faculté de Pharmacie de Nantes : Abderrahmane, Aurélie, Christine, Gaétane, Isabelle, Marjorie, Nathalie, Samuel, Vony. Il fait bon appartenir à ce département pour partager votre bonne humeur et tous les moments d'échanges à tous points de vue. Certains d'entre vous sont devenus de véritables amis.

Merci également à tous les membres du laboratoire Mer, Molécules, Santé et particulièrement le directeur, Pr Yves-François Pouchus pour son accueil au sein du laboratoire ainsi que son aide et ses précieux conseils pour la première partie de ce dossier de demande d'HDR. Je ne vais pas citer toutes les personnes d'MMS auxquelles je pense et qui ont participé de près ou de loin à la bonne humeur dans le travail, la réalisation de projets, d'expériences, de publications... Ils se reconnaîtront !

Je tiens à remercier tous les étudiants qui ont participé à l'avancée des travaux de recherche, grâce à leur venue dans notre équipe, que ce soit comme stagiaire ou doctorant : Amina, Anne-Isaline, Carole, Fayza, Marjorie, Nam, Pierre, Romain, Samuel. Votre travail est indispensable à l'avancée des travaux de l'équipe et me permet aujourd'hui en partie de proposer ce dossier de demande d'HDR.

Je remercie également toutes les personnalités qui ont été mes collaborateurs, de près ou de loin, dans les différentes réponses à appel à projet, les projets, les encadrements d'étudiants... Je ne peux vous citer un à un, mais sachez que travailler à vos côtés a été très

enrichissant et souvent productif. Je pense notamment à ceux de Marseille que je suis contente de voir à chaque fois que j'y retourne !

Enfin je termine par remercier chaleureusement toute ma famille pour tout le bonheur qu'elle m'apporte, qui me soutient dans le travail et sans qui je n'aurais pas pu réaliser mes études, ce début de carrière et proposer ce dossier. Il n'est pas facile dans notre métier d'arriver à dissocier la vie professionnelle et personnelle. Les deux sont tellement prenantes et demandent un tel investissement qu'il me faudrait peut-être plusieurs vies pour arriver à être entièrement satisfaite. Le principal est de faire au mieux et surtout de faire la part des choses sans qu'une vie empiète sur l'autre. C'est comme en chimie, il faut respecter la stœchiométrie pour pouvoir équilibrer les équations !

Table des matières

Liste des abréviations	IX
Liste des Tableaux.....	XIII
Liste des Figures.....	XIV
 Première partie : Présentation détaillée du candidat	 1
CHIMISTE DE L'ENVIRONNEMENT – ECOTOXICOLOGUE	
I. Curriculum vitae.....	4
I.1. Notice individuelle	4
I.2. Diplômes	4
I.3. Expériences professionnelles	4
I.4. Stages de formation.....	5
I.5. Autres	5
II. Enseignement	6
II.1. Activités d'enseignement	6
II.1.1 Maître de conférences	6
II.1.2 Attachée temporaire d'enseignement et de recherche.....	9
II.1.3 Monitrice	9
II.2. Responsabilités pédagogiques et administratives.....	10
II.3. Bilan	10
III. Recherche	12
III.1. Participation à des programmes scientifiques	12
III.1.1 En tant que porteuse du projet.....	13
III.1.2 En tant que responsable scientifique pour MMS.....	13
III.1.3 En tant que partenaire.....	13
III.2. Collaborations scientifiques	14
III.3. Encadrement de la recherche.....	15
III.3.1 Doctorat.....	15
III.3.2 Master 2.....	16
III.3.3 Autres encadrements.....	17
III.4. Expertise.....	17
III.4.1 Membre de jury de thèse	17
III.4.2 Révisions d'articles scientifiques.....	18
III.5. Bilan	18
IV. Valorisation des travaux	20
IV.1. Articles scientifiques	20
IV.2. Ouvrage	23
IV.3. Conférence sur invitation personnelle.....	23
IV.4. Communications orales.....	24
IV.5. Communications affichées.....	27
IV.6. Bilan.....	31

Deuxième partie : Synthèse des travaux de recherche	35
---	----

ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES HAP, LES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES ET LES MICROPLASTIQUES

I. Préambule	37
II. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	41
II.1. Présentation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	42
II.2. Les feux de forêt : source naturelle des HAP.....	44
II.2.1 La contamination en HAP des sols de la forêt incendiés du Massif des Maures	44
II.2.2. L'imprégnation en HAP des végétaux après des feux de forêt.....	46
II.3. La contamination en HAP du milieu estuarien ligérien.....	47
II.3.1. La contamination en HAP des sédiments de l'estuaire de la Loire	48
II.3.2. L'imprégnation en HAP de deux espèces de poissons de Loire.....	51
II.4. Bilan sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	55
III. Les nanoparticules métalliques	56
III.1. Présentation des nanoparticules métalliques.....	57
III.2. Mise en place expérimentale	58
III.2.1. Expositions en aquariums vs mésocosmes	58
III.2.2. Designs expérimentaux	59
III.2.3. Nanoparticules, nanomatériau et nanoproduit étudiés.....	59
III.2.4. Évaluation du devenir des nanoparticules métalliques	60
III.2.5. Évaluation de l'imprégnation des organismes modèles endobenthiques	60
III.3. Devenir des nanoparticules métalliques en milieux contrôlés.....	61
III.3.1 Colonne d'eau.....	61
III.3.2 Sédiment.....	63
III.4. Imprégnation des organismes en milieux contrôlés.....	65
III.4.1 Exposition par contamination du milieu aquatique.....	65
III.4.2 Exposition par contamination de l'alimentation	69
III.5. Bilan sur les nanoparticules métalliques.....	70
IV. Les microplastiques.....	72
IV.1. Présentation des microplastiques	73
IV.2. Les difficultés de l'analyse des microplastiques dans l'environnement.....	75
IV.3. La mise au point des procédures d'analyse des microplastiques.....	77
IV.3.1 Protocole de préparation des échantillons de moules	78
IV.3.2 Protocole de préparation des échantillons de sédiment	79
IV.3.3 Analyse des filtres par spectroscopie FT-IR.....	80
IV.4. Les microplastiques dans l'environnement côtier des Pays de la Loire	80
IV.4.1 Les moules et les huîtres	81
IV.4.2 Les sédiments	84
IV.5. Bilan sur les microplastiques.....	86

Troisième partie : Projets de recherche à venir associés à leur contexte..... 89

DES SOURCES DE CONTAMINATION A L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES MILIEUX

I. Projet continuum terre-mer	91
I.1. Étude sur la prairie de Mauves	91
I.2. Étude sur le Pont de Cheviré	93
I.3. Projet à venir	94
II. Les éléments terres rares	95
II.1. Présentation des terres rares	95
II.2. Étude en cours	98
II.2.1 Les objectifs.....	98
II.2.2 Les premiers résultats	98
II.3. Perspectives à court terme.....	100
II.4. Projet à venir	101
III. Développement de la SPIR en écotoxicologie.....	102
III.1. La spectroscopie proche infrarouge.....	102
III.1.1 Généralités.....	102
III.1.2. La SPIR en environnement.....	103
III.2. Projet à venir.....	104
Conclusion.....	107
Références bibliographiques	111
Annexes	123

Liste des abréviations

A

ABS : Acrylonitrile Butadiène Styrène
Ac : Acénaphthylène
ACBPI : Analyse et Contrôle : des Biomolécules aux Produits Industriels
AChE : Acétylcholinestérase
Ace : Acénaphène
ACES : AquaCulture, Environment and Society
AFECAB : Association Française des Enseignants de Chimie Analytique et de Bromatologie des facultés de pharmacie
ATER : Attachée temporaire d'enseignement et de recherche
Ant : Anthracène
ANR : Agence Nationale à la Recherche
AOI : Appel d'Offre Interne
AP: Alkylphénols
ASE : Accelerated Solvant Extraction
A3M : Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments

B

BBRT : Biologie Biotechnologies et Recherche Thérapeutique
BDM : Biomatériaux et Dispositifs Médicaux
BMTI : Biothérapies et Médicaments de Thérapies Innovantes
B(a)Ant : Benzo(a)anthracène
BS : Biologie-Santé
B(a)Pyr : Benzo(a)pyrène
B(b)Fla : Benzo(b)fluoranthène
B(ghi)P : benzo(g,h,i)pérylène
B(k)Fla : Benzo(k)fluoranthène

C

CAT : Catalase
CEA : Centre d'Énergie Atomique
CCPS : Contrôle et Contrefaçon des Produits de Santé
CEEP : Conservatoire Études des Ecosystèmes de Provence, alpes du sud
CEREGE : Centre Européen de Recherche et Enseignement des Geosciences de l'Environnement
CHARME : Chimie Analytique Réactionnelle et Modélisation en Environnement
ChiChaMVa : Chimiodiversité des Champignons Marins et Valorisations
Chry : Chrysène
CLHP-DFP: Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un Détecteur de Fluorescence Programmable
CQPS : Contrôle Qualité des Produits de Santé
COT : Carbone Organique Total
CM : Cours Magistraux
CMR : Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique
CRM : Matériau de Référence Certifié

D

DEN : Direction de l'Énergie Nucléaire
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM : Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DGT : Diffusive Gradients in Thin films
DiB(a,h)Ant : Dibenzo(a,h)anthracène

E

EBM : Écosystèmes et Bioproduction Marine
ECEm : Écotoxicologie des Contaminants Emergents en milieux côtiers et estuariens
ECHA : European Chemicals Agency
ECOBIO : Écosystèmes, Biodiversité, Évolution
ENVICAE : Environnement, Chimie Analytique et Écosystèmes
EMBRAPA : Brazilian Agricultural Research Corporation
EPOC : Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux
EU : European Union

F

F : Fluorène
Fluo : Fluoranthène
FT-IR : Infra-Rouge à Transformée de Fourier

G

GAED : Géographie, Aménagement, Environnement et Développement
GAEM : Géographie, Aménagement des Espaces Maritimes
GEMA : Gestion des Milieux Aquatiques
GERINAT : Gestion des Risques Naturels
GRISSE : Gestion des Risques - Santé Sécurité Environnement
GST : Glutathion S Transférase

H

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBCD : Hexabromocyclododécane
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

I

ICP-AES : torche à plasma couplée à la spectrométrie d'émission atomique
ICPE : Installations Classées Pour l'Environnement
ICP-MS : torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse
IEA : Isotopome pour l'Environnement et l'Authentification
IEC : Institut Evandro Chagas
IF : Impact Factor
IFSTTAR : Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux
IGARUN : Institut de Géographie et d'Aménagement Régional de l'Université de Nantes
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IMMM : Institut des Molécules et des Matériaux du Mans
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
IPyr : Indéno(1,2,3-cd)pyrene
IREP : Registre des Émissions Polluantes
ISM2 : Institut des Sciences Moléculaire de Marseille

J

JRC Joint Research Center

K

K_{ow} : partage octanol-eau

L

LABERCA : Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments

LARC : Laboratoire d'Analyse Radiochimique

LCE : Laboratoire Chimie Environnement

LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

LCP : Laboratoire Chimie Provence

LEE : Laboratoire Eau et Environnement

LEESU : Laboratoire Eau et Environnement des Systèmes Urbains

LICAS : Life Cycle Assessment of Ship

LIEC : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

LIENSs : Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés

LIST : Luxembourg Institute of Science and Technology

LPG : Laboratoire de Planétologie et Géodynamique

LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

M

MAEVA : Management de l'Environnement, Valorisation et Analyse

MMS : Mer, Molécules, Santé

N

Na : Naphtalène

NIR : Near Infrared

NM : Nanomatériaux

O

OSUNA : Observatoire des Sciences de l'Univers de Nantes Atlantique

P

PACES : Première Année Commune des Études de Santé

PBDE : Polybromodiphényléthers

PCB : Polychlorobiphenyles

PCDD/F : Dioxines et furanes

PE : Polyéthylène

PET : Polyéthylène Téréphtalate

PEC : Predicted Environmental Concentration

PEDR : Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche

Phe : Phénanthrène

PNEC : Predicted No Effect Concentration

POP : Polluant Organique Persistant

PP : Polypropylène

PSU : Practical Salinity Unit

PVC : Polychlorure de Vinyle

Pyr : Pyrène

P2AON : Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle

Q

Q : Quartile

QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship

R

REACH : Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

S

SAE : Sciences de l'Atmosphère et de l'Espace

SCF : Scientific Committee for Food

SDM : Sciences Du Médicament

SIR : Stage d'Initiation à la Recherche

SMIDAP : Syndicat mixte pour le développement de l'aquaculture et de la pêche en Pays de la Loire

SMPC : Service des Matériaux Polymères et Composites

SPIR : Spectroscopie Proche Infrarouge

SPMD : Semipermeable Membrane Device

STE : Sciences de la Terre et de l'Environnement

STEP : Station d'Épuration

STP : Sciences de la Terre et des Planètes

STUE : Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement

SOD : Superoxyde dismutase

SVTE : Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement

T

TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TD : Travaux Dirigés

TE : Toxicologie et Écotoxicologie

TopCos : Topiques et Cosmétiques

TP : Travaux Pratiques

U

UCO : Université Catholique de l'Ouest

UFR: Unité de Formation et de Recherche

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

US-EPA: Environmental Protection Agency of United States

W

WEOM: Water Extractible Organic Matter

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des charges d'enseignements de maître de conférences.....	6
Tableau 2 : Récapitulatif des enseignements dispensés en tant que maître de conférences	8
Tableau 3 : Récapitulatif des charges d'enseignements d'ATER.....	9
Tableau 4 : Récapitulatif des charges d'enseignements de monitrice	9
Tableau 5 : Récapitulatif des participations à des programmes scientifiques.....	12
Tableau 6 : Frise chronologique des programmes de recherche	12
Tableau 7 : Récapitulatif de l'encadrement de la recherche	15
Tableau 8 : Récapitulatif des révisions d'articles scientifiques	18
Tableau 9 : Récapitulatif de la valorisation des travaux de recherche.....	20
Tableau 10 : concentrations en métabolites de HAP dans la bile de 3 femelles de bars adultes	53
Tableau 11 : Caractéristiques des nanoparticules métalliques étudiées.....	59
Tableau 12 : Résultats quantitatifs globaux de la contamination en microplastiques dans les eaux marines	75
Tableau 13 : Résultats quantitatifs globaux de la contamination en microplastiques dans les sédiments et sables marins.....	75
Tableau 14 : Points testés des étapes clés de la préparation des échantillons de moules ..	78

Liste des Figures

Figure 1 : Répartition publications en fonction du facteur d'impact du journal.....	32
Figure 2 : Répartition des publications en fonction du quartile du journal	32
Figure 3 : Évolution du nombre de publications et de citations au cours du temps. Graphique issu de www.scopus.com avec le nom Aurore Vergnoux, le 27/01/19	32
Figure 4 : Répartition des publications en fonction du rang de mon nom parmi les auteurs	33
Figure 5 : Méthode d'évaluation du risque environnemental.....	38
Figure 6 : Positionnement de la chimie environnementale, la biologie, la biochimie, la physiologie et la toxicologie en écotoxicologie.....	40
Figure 7 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct par année avec [PAH ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019).....	42
Figure 8 : Noms, formules développées, masses moléculaires et abréviations utilisées pour la liste des 16 HAP prioritaires selon l'US-EPA.....	43
Figure 9 : Profils de distribution des HAP en fonction de leur nombre de cycles aromatiques, des horizons de surface (0 à -5 cm) des sols affectés par un feu très récent (année n-1) et des témoins.....	44
Figure 10 : Evolution temporelle de l'indice I_{TE} pour les horizons A (0 -5 cm).....	45
Figure 11 : Teneurs en 14 HAP dans 5 espèces végétales issues d'un site brûlé l'année n-1 et d'un site témoin	47
Figure 12 : Carte des points de prélèvements de sédiments et de poissons, de l'aval vers l'amont.....	48
Figure 13 : Teneurs en 14 HAP prioritaires dans les sédiments des zones intertidales (n = 4) et subtidales (n = 1) de l'estuaire de la Loire (en $\mu\text{g/kg}$ de sédiment sec).....	49
Figure 14 : Distributions des HAP en fonction de leur nombre de cycles aromatiques dans les sédiments des zones intertidale et subtidale de l'estuaire de la Loire (en %).....	50
Figure 15 : Teneurs en HAP dans les muscles et les restes de bar en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids frais	51
Figure 16 : Profils des HAP dans les muscles et restes de bar en fonction du nombre de cycles	52
Figure 17 : Profils des métabolites de HAP quantifiés dans la bile d'anguilles européennes de l'estuaire de la Loire au stade de maturité jaune issues de 3 sites	54
Figure 18 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [nanoparticle ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)	57
Figure 19 : Schéma du dispositif expérimental avec un système de cycle de marée artificiel déployé en extérieur sur le site de l'Houmeau, près de La Rochelle ...	58
Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental avec un système de cycle de marée artificiel déployé en extérieur sur le site de l'Houmeau, près de La Rochelle ...	60

Figure 21 : Moyennes (et écarts-types, n = 3) des masses de métal labile (Cd, Cu, Ag) accumulées par les DGT déployées dans la colonne d'eau des aquariums et mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à différents temps (0, 3, 7 et 14 ou 16 jours pour les aquariums et 0, 7, 14, 21 jours pour les mésocosmes), exprimées en ng.....	62
Figure 22 : Moyennes (et écarts-types, n = 3) des masses de métal labile (A : Cu, B : Ag) accumulées par les DGT déployées dans le sédiment des mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à différents temps (0, 7, 14, 21 jours), exprimés en ng	63
Figure 23 : Moyennes (n = 3) des masses de métal labile (A :Cu, B :Ag) accumulées par les DGT déployées dans le sédiment des mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à 21 jours d'exposition en fonction de la profondeur, exprimées en ng.....	64
Figure 24 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en métaux (Cd, Cu, Ag) bioaccumulés par deux espèces endobenthiques (<i>Scobicularia plana</i> et <i>Hediste diversicolor</i>) aux temps finaux d'exposition en laboratoire (14 j et 16 j en aquarium pour Cd et Cu ainsi que 21 j en mésocosme pour Cu et Ag), exprimées en ng.g ⁻¹ de tissus frais	66
Figure 25 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en argent mesurées dans la glande digestive de <i>S. plana</i> après 7 jours d'exposition à quatre conditions (contrôles, argent soluble, solution dispersante et nanomatériau d'argent) à deux salinités (15 et 30 PSU), exprimées en ng.g ⁻¹ de tissus secs.....	68
Figure 26 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en argent mesurées dans la glande digestive de <i>S. plana</i> après 7 jours d'exposition à quatre conditions (contrôles, nanoproduit Acticoat™, nanomatériau d'argent NM-300K et solution dispersante) à deux salinités (15 et 30 PSU), pour deux conditions de nourrissage (avec et sans), exprimées en ng.g ⁻¹ de tissus secs	69
Figure 27 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [microplastic ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)	73
Figure 28 : Procédure de préparation des échantillons de moules	79
Figure 29 : Points d'échantillonnage de la côte de la région Pays de la Loire.....	80
Figure 30 : Microplastiques dans les moules (I) et les huîtres (II) en fonction du site de prélèvement, la saison et le mode de vie	81
Figure 31 : Analyse qualitative des microplastiques trouvés dans les moules (a) et les huîtres (b). Distribution en fonction du type de plastique (I), de la couleur (II) et de la taille (III)	83
Figure 32 : Moyenne du nombre de microplastiques trouvé dans le sédiment en fonction du nombre de prises d'essai de 25 g analysé	84
Figure 33 : Abondance des microplastiques dans les sédiments du littoral de la région Pays de la Loire en 3 sites (Pen Bé, Coupelasse, baie de l'Aiguillon) en octobre 2015 (October) et mars 2016 (March), exprimé en nombre par kg de sédiment sec.....	85
Figure 34 : Analyse qualitative des microplastiques trouvés dans les sédiments. Distribution en fonction du type de plastique (I), de la couleur (II) et de la taille (III).....	85

Figure 35 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [rare earth element ^ environment ^ ecotoxicology] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019).....	96
Figure 36 : Nombre d'articles référencés entre 1980 et 2014 sur l'utilisation de la spectroscopie non destructive appliquée à des échantillons environnementaux solides (sols, sédiments, biote), liquides ou gazeux (d'après Gredilla et al., 2016).....	103
Figure 37 : L'écotoxicologie et le positionnement de mes activités de recherche passées et en cours en bleu et à venir en rouge.....	110

Première partie :

Présentation détaillée du candidat

CHIMISTE DE L'ENVIRONNEMENT-ECOTOXICOLOGUE

Fiche de synthèse

Aurore ZALOUK-VERGNOUX

Née le 25 novembre 1982

ECOTOXICOLOGUE-CHIMISTE DE L'ENVIRONNEMENT

Formation

- **Doctorat Sciences de l'Environnement.** Spécialité : chimie de l'environnement. Université de Provence, 2009
- **Master Recherche "Chimie Analytique Réactionnelle et Modélisation en Environnement".** Université de Provence, 2006
- **Master Professionnel "Management de l'Environnement, Valorisation et Analyse".** Option : Gestion et Traitement des Déchets. Université Paul Cézanne, 2005

Activités d'enseignement et de recherche actuelles

Maître de Conférences 85^e section, Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, depuis 2010

- **Enseignement : en Chimie analytique** dans le Département de Chimie Générale, Minérale et Analytique de la Faculté de Pharmacie. Enseignement : 223 heures par an équivalent TD en moyenne sur les 5 dernières années, en Pharmacie et dans différents Masters de l'Université
- **Administration :**
 - **Co-responsable du M2** Contrôle Qualité des Produits de Santé
 - **Responsable du Tronc Commun du M2** Sciences du Médicament
 - **Co-responsable des plannings de TD et TP** du 1^{er} semestre de 2^e année de pharmacie
 - **Responsable de l'UE** « Problématiques environnementales » du M2 Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments
 - **Responsable de l'UE** « Initiation à l'œnologie » de 5^e année de pharmacie
- **Recherche :** au sein du laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS - EA 2160), **titulaire de la PEDR** depuis 2014.
Domaine de recherche : écotoxicologie, chimie de l'environnement
 - **Publications :** 24 (IF moyen = 3,32) dont 6 en 1^{er} auteur et 2 en dernier, H-index = 14
 - **Ouvrage :** 1 en co-auteur
 - **Communications :** invitée : 1, orales : 26, affichées : 25
 - **Encadrements de stages :** SIR : 6, M1 : 6, M2 : 6
 - **Co-encadrement de thèses de Doctorat :** 4 dont 3 soutenues
 - **Programmes de recherche :** porteuse : 2, responsable MMS : 3, participante : 11
 - **Rayonnement scientifique :** jurys de thèse de doctorat : 4, révisions d'articles : 29

<https://orcid.org/0000-0001-5619-1596>

<https://scholar.google.fr/citations?user=nD-x868AAAAJ&hl=fr>

I. Curriculum vitae

I.1. Notice individuelle

Aurore ZALOUK-VERGNOUX

Née le 25 novembre 1982, à Privas (07), nationalité française

Situation de famille : mariée, 2 enfants

Adresse personnelle : 9 impasse de la Gautellerie 44860 Pont Saint Martin

☎ 06 69 92 08 53 ; ✉ aureore_vergnoux@hotmail.com

Fonction actuelle : **Maître de conférences à l'Université de Nantes**

Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160)

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

9 rue Bias – BP 61112

44 035 Nantes cedex 1

☎ 02 53 48 43 09/02 76 64 50 79 ; ✉ aureore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr

ECOTOXICOLOGUE-CHIMISTE DE L'ENVIRONNEMENT

Titres : - Docteur en Sciences de l'Environnement, spécialité ; Chimie de l'Environnement
- Ingénieur-Maître en Génie de l'Environnement, option : Environnement, Chimie Analytique et Écosystèmes.

I.2. Diplômes

- 2006-2009 **Doctorat Sciences de l'Environnement**. Spécialité : chimie de l'environnement. Université de Provence. UFR des Sciences et Techniques. Laboratoire Chimie Provence (LCP, Marseille) et de l'Institut des Sciences Moléculaire de Marseille (ISM2, Aix-en-Provence). École doctorale : Sciences de l'Environnement.
Soutenue le 4 décembre 2009. Mention très honorable avec les félicitations du jury.
Direction : Pr Pierre Doumenq et Dr Frédéric Théraulaz
- 2005-2006 **Master Recherche "Chimie Analytique Réactionnelle et Modélisation en Environnement" (CHARME)**. Université de Provence. Marseille.
Major, mention très bien.
- 2004-2005 **Master Professionnel "Management de l'Environnement, Valorisation et Analyse" (MAEVA)**. Option : **Gestion et Traitement des Déchets**. Université Paul Cézanne. Marseille. Major, mention bien.
- 2001-2002 **DEUG, Licence et Maîtrise "Génie de l'Environnement"**. IUP Environnement, Technologies et Société. Option : **Environnement, Chimie Analytique et Écosystèmes (ENVICAE)**. Université de Provence. Marseille. Mentions assez bien.
- 2000 **Baccalauréat Scientifique**. Spécialité : physique-chimie. Académie de Grenoble, Lycée Vincent d'Indy. Privas (07). Mention assez bien.

I.3. Expériences professionnelles

- 2010 à ce jour **Maître de Conférences 85^e section**, Université de Nantes, Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS EA 2160), équipe Écotoxicologie des Contaminants Émergents en milieux côtiers et estuariens (ECEm)
Titulaire de la Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche (PEDR) de 2014 à 2022

- 2010 **ATER**, Université de Nantes, Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS EA 2160)
- 2006-2009 **Monitorat et doctorat**, Université de Provence, Laboratoire Chimie Provence (LCP, Marseille) et de l'Institut des Sciences Moléculaire de Marseille (ISM2, Aix-en-Provence)
(37 mois)

I.4. Stages de formations

- 2005-2006 **Stage de Master 2 CHARME**, Université de Provence, Laboratoire Chimie Provence (LCP, Marseille) et de l'Institut des Sciences Moléculaire de Marseille (ISM2, Aix-en-Provence)
(6 mois)
Étude de l'effet des feux de forêt sur la teneur en carbone organique et en HAP des sols
Encadrants : Pr Pierre Doumenq et Dr Frédéric Théraulaz
- 2004-2005 **Stage de Master 2 MAEVA** à Biotechna, filiale du Groupe des Eaux de Marseille spécialisée dans le compostage des déchets organiques.
(6 mois)
Étude de la maturité du compost par spectroscopie proche infrarouge couplée à des traitements chimiométriques
Encadrant : Dr Michel Guillianio et Claude Nervi (Société Biotechna)
- 2003-2004 **Stage ingénieur maître** à la Communauté Urbaine de Marseille Provence Métropole, au sein de la Direction du Traitement des Déchets.
(4 mois)
Mise en place d'un mode de gestion des déchets dans le port de la Pointe Rouge
Encadrante : Pr Catherine Massiani
- 2002-2003 **Application en milieu professionnel** dans le cadre de la licence Génie de l'Environnement
(3 mois)
Étude de l'impact des rejets de la ville de Salon de Provence et des prélèvements sur un cours d'eau : la Touloubre
- 2001-2002 **Stage** pour le Conservatoire Études des Écosystèmes de Provence, Alpes du sud (CEEP), sur l'évaluation patrimoniale de l'espace naturel du Frioul. Marseille.
(2 mois)
Étude de la répartition de la population du Phyllodactyle d'Europe sur les îles du Frioul et synthèse des résultats par cartographie à l'aide de MapInfo

I.5. Autres

Sauveteur Secouriste du Travail depuis 2007, délivré par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) et renouvelé régulièrement.

Membre de l'association française des enseignants de chimie analytique et de bromatologie des facultés de pharmacie (AFECAB) depuis 2011.

Présidente de l'association « à l'eau bébé Rezé » depuis 2018 qui compte plus de 170 inscrits. Vice-présidente en 2017-2018, membre du bureau depuis 2015-2016.

II. Enseignement

II.1. Activités d'enseignement

II.1.1 Maître de conférences

2010 à ce jour Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Direction : Pr Christine Herrenknecht

Le Tableau 1 montre que je suis intervenue à tous les niveaux du 1^{er} au 3^e cycle des études universitaires à la faculté de pharmacie, mais également à la faculté des sciences et techniques. Depuis 2017-2018, j'interviens exclusivement en 2^e et 3^e cycle des études universitaires. Ces enseignements correspondent à des cours magistraux (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP) avec une moyenne d'environ 234 heures par an en équivalent TD.

Tableau 1 : Récapitulatif des charges d'enseignements de maître de conférences (en équivalent TD)

	PACES	2 ^e A pharma.	3 ^e A pharma. et L3	4 ^e A pharma	5 ^e A pharma.	Masters	Masters hors Nantes	TOTAL Nantes
2010/2011	48	116	4		24	76		268
2011/2012	70	20	50	22	50	38		250
2012/2013	96	30	35	17	44	55	32	277
2013/2014*		24	41	28	30	72	41	195
2014/2015			39	35	30	144	24	248
2015/2016*			30	23	42	153	24	248
2016/2017			40	21	42	112	21	215
2017/2018				29	54	126	15	209
2018/2019				39	50	108	20	197

* années pour lesquelles j'ai bénéficié d'une décharge d'enseignements pour congés de maternité

Les formations dans lesquels je suis intervenue, ou j'interviens encore, ainsi que leur effectif approximatif :

- **Études de pharmacie**

Première année commune des études de santé (PACES ; 1300 étudiants)

2^e année de pharmacie (2A ; numerus clausus : 103 étudiants)

3^e année de pharmacie (3A)

4^e année de pharmacie (4A) tronc commun et parcours industrie (4A Ind.)

5^e année de pharmacie, parcours Industrie (5A Ind. ; 40 étudiants)

- **2^e cycle des études universitaires**

Licence Professionnelle de Cosmétologie (20 étudiants)

Masters 1 :

M1 Biologie-Santé (BS), parcours Biologie Biotechnologies et Recherche Thérapeutique (BBRT ; 35 étudiants)

M1 Risques et Environnement, parcours Gestion des Risques - Santé Sécurité Environnement (GRISSE ; 18 étudiants)

- **3^e cycle des études universitaires**

Masters 2 :

M2 Sciences du Médicament (SDM ; 45 étudiants) : Tronc commun des 5 parcours Topiques et Cosmétiques (TopCos), Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle (P2AON), Biomatériaux et Dispositifs Médicaux (BDM), Biothérapies et Médicaments de Thérapies Innovantes (BMTI), Contrôle et Contrefaçon des Produits de Santé (CCPS)

M2 Chimie, parcours Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments (A3M), option Analyse et Contrôle : des Biomolécules aux Produits Industriels (ACBPI ; 20 étudiants), Contrôle Qualité des Produits de Santé (CQPS ; 8 étudiants) et Isotopome pour l'Environnement et l'Authentification (IEA ; 3 étudiants)

M2 Risques et Environnement, parcours GRISSE (24 étudiants)

M2 Sciences de la Terre et des Planètes (STP), Environnement, parcours Ecosystèmes et Bioproduction Marine (EBM ; 10 étudiants environ) et/ou AquaCulture, Environment and Society (ACES, Erasmus Mundus ; 20 étudiants)

M2 Géographie, Aménagement, Environnement et Développement (GAED), parcours Géographie, Aménagement des Espaces Maritimes (GAEM ; 20 étudiants)

- **Hors Université de Nantes**

M2 Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement (STUE), parcours Sciences de l'Atmosphère et de l'Espace (SAE ; Université d'Orléans ; 10 étudiants)

M1 et M2 Toxicologie et Ecotoxicologie (TE ; 25 étudiants), parcours Toxicologie environnementale et humaine (Université d'Angers et Université du Mans)

École centrale de Nantes : Ingénieur généraliste, Option de 3^e année sur la transition écologique (25 étudiants)

Ces enseignements me permettent d'utiliser à la fois de la pédagogie traditionnelle, mais également des méthodes innovantes (active, inversée, en visioconférence) sur des publics aussi bien en formation initiale qu'en alternance (Tableau 2). Par ailleurs, je dispense également certains enseignements en anglais pour des étudiants du Master Erasmus Mundus qui ont une provenance internationale. Comme le montre le Tableau 2, j'ai créé ou participé à la création de 43h de TP, 43h de TD et 40 de CM (en vert dans le Tableau 2).

Tableau 2 : Récapitulatif des enseignements dispensés en tant que maître de conférences

Discipline	Intitulé	Public	Durée (eq.TD)	Type	Pédagogie	Création
Chimie générale et analytique	Chimie générale	PACES	10	TD	T	*
	Formation pratique initiale	2A	6	TP	T	
	Chimie générale	2A	8	TP	T	
	Chimie analytique (CMM, UV-Vis)	2A	6	TD	T	
	SEA/SAA	M2 CQPS	7,5	CM	T	
	Méthodes de dosages électrochimiques	M2 CQPS	6	CM	T	#
Contrôles analytiques	Contrôle de produits finis	3A	15	TP	A	*
	Contrôle analytique des cosmétiques	L3	12	CM	T	
			12	TP		#
	Projet qualité	4A Ind.	10	TP	A	#
	Préparation d'échantillons	5A Ind.	6	CM	T	#
			6	TP	A	#
	Projet CTD	5A Ind.	25	TP	A	
Statistiques	Validation de méthodes	4A Ind	3	CM	T	#
		M2 SDM	10	TD		#
	Environnement-Santé	4A	6	CM	T	
Écotoxicologie	Introduction à l'écotoxicologie	M2 GAEM	9	CM	T	#
		M2 SAE Ingénieur				
	Tests de toxicité (Bioessays)	M1 BS	4,5	CM	T	#
		M2 ACES				
	Biosurveillance de l'environnement (environnemental biomonitoring)	M1 BS	3	CM	T	#
		M2 GRISSE			I a	*
Chimie de l'environnement	Food safety	M2 ACES	3	CM	T	#
		M2 ACES				
	Cycles de l'eau et biogéochimiques	M1 GRISSE	7,5	CM	I a	#
		M1 TE			T	
	Analyse environnementale (environmental analysis)	M1 GRISSE	12	TP	I a	
		M2 ACES			T	
	Classes de polluants et réglementations	M2 IEA	12	CM	T	*
	Étude de cas appliquée	M2 IEA	8	TD	A	*
	Dossier thématique sols contaminés	M2 GRISSE	15	TD	A a	*
	Cas d'études	M2 TE	4,5	CM	T	#

T : pédagogie traditionnelle ; A : pédagogie active ; I : pédagogie inversée ; a : formation en alternance

* : Création de l'UE et des enseignements ; # : Création des enseignements

II.1.2 Attachée temporaire d'enseignement et de recherche (ATER)

2010 Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Direction : Pr Christine Herrenknecht

Tableau 3 : Récapitulatif des charges d'enseignements d'ATER (en équivalent TD)

Heures équivalent TD			
	3 ^e A pharma.	Masters	TOTAL
2010	76	20	96

3^e année de pharmacie : **TP chimie analytique** (114h)

M2 Chimie, parcours Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments (A3M), option Analyse et Contrôle : des Biomolécules aux Produits Industriels (ACBPI) et Contrôle Qualité des Produits de Santé (CQPS) : **TP qualification d'appareillage analytique** (20h)

II.1.3 Monitrice

2006-2009 Université de Provence, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement (SVTE). Marseille

Tableau 4 : Récapitulatif des charges d'enseignements de monitrice (en équivalent TD)

Charges d'enseignements en heures équivalent TD						
	1 ^{ère} A IUT	Licence 1	Licence 3	Masters	Autre	TOTAL
2006/2007	64					64
2007/2008	64					64
2008/2009		13	12	30	20	75

1^{ère} année d'IUT Génie Biologique (site de Digne-les-Bains) **TP chimie générale** et **TP chimie analytique** (64 h)

Création et animation d'**ateliers sur le cycle de l'eau** à la Maison des Sciences de l'Université de Provence (20h).

Licence 1 et 3 Sciences de la Terre et de l'Environnement (STE) : **Cours et TD méthodologies en Chimie** (2h et 10h), **TP chimie de l'environnement** (12h)

M1 et M2 : Gestion des Milieux Aquatiques et Gestion des Risques Naturels (GEMA et GERINAT) **CM stratégie d'échantillonnage et préparation d'échantillons** (2x10h) ; j'ai entièrement créé 10h de CM sur la stratégie d'échantillonnage et la préparation d'échantillons.

II.2. Responsabilités pédagogiques et administratives

- **Co-responsable du Master 2 CQPS** depuis 2014
- **Co-responsable du M1 GRISSE** de 2014 à 2016 puis **co-responsable du M2 GRISSE** en 2016/2017
- **Co-responsable du planning des TD et TP du 1^{er} semestre de 2^e année de pharmacie** depuis 2013
- **Responsable du Tronc Commun du M2 Sciences du Médicament** depuis 2017
- **Responsable de l'UE « Initiation à l'œnologie » de 5^e année de pharmacie** depuis 2011
- **Responsable de l'UE « Problématiques environnementales » du M2 A3M** depuis 2017

II.3. Bilan

Le Tableau 1 de mes charges d'enseignement en tant que maître de conférences montre qu'elles étaient systématiquement bien supérieures à 192 heures chaque année depuis mon recrutement. Malgré la PEDR qui m'a été attribuée en 2014, les décharges que j'ai obtenues en 2013/2014 et 2016/2017 pour des congés de maternité et mon travail à temps partiel (90%) en 2017/2018, ma charge d'enseignement était excédentaire.

Mes enseignements sont divers et touchent principalement la chimie analytique, la validation de méthodes d'analyse et l'écotoxicologie. Ces domaines correspondant à mes domaines de recherche, mes enseignements peuvent donc partiellement s'inspirer de mes travaux, ce qui constitue de la formation par la recherche.

Mes activités d'enseignement m'ont permis d'acquérir un certain nombre de compétences. Je suis capable de créer, mettre au point, adapter et enseigner selon différentes pédagogies (classique, active, inversée, en visioconférence), des cours, des travaux dirigés et des travaux pratiques adaptés à différents publics : étudiants de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, l'UFR des Sciences et Techniques, l'UFR Institut de Géographie et d'Aménagement Régional de l'Université de Nantes (IGARUN), l'école centrale de Nantes.

Mes enseignements à différents niveaux des études de pharmacie, en licence et dans 8 masters différents m'ont appris à adapter mon discours en fonction de l'auditoire qui peut être très varié, à la fois entre les formations, mais aussi au sein même d'une promotion. Même si le thème général d'un enseignement peut être le même pour différentes formations, le contenu est modelé pour permettre à chacun d'acquérir les connaissances et les compétences nécessaires.

L'investissement le plus important dans mes activités d'enseignement a été la participation à la projection, la mise en place et l'ouverture du M1 GRISSE à la rentrée 2014/2015 afin de fournir un vivier d'étudiants ayant des bases solides nécessaires à la poursuite en M2 GRISSE déjà existant. Ce fut une expérience enrichissante. Mon implication dans la responsabilité de ce master tout comme celle du master CQPS (puis CCPS) m'a aussi permis de gérer la coordination des enseignements en fonction des compétences et des connaissances nécessaires aux étudiants pour leurs activités professionnelles futures dans des domaines variés. J'ai ainsi participé au recrutement d'étudiants, à la validation et aux suivis des stages, à l'attribution des tuteurs, aux jurys d'année et la réalisation des plannings parfois compliquée

avec la mutualisation des enseignements entre différents masters. Mon intégration dans le master GRISSE, qui est une formation en alternance, m'a permis de m'initier à la pédagogie inversée, qui est une forme de pédagogie qualifiée d'innovante et qui est pratiquée au sein du master depuis de nombreuses années. J'ai ainsi appris à adapter mes enseignements à des phases d'enseignements à distance alternées avec des phases en présentiel, permettant à l'étudiant d'être plus actif, plus présent en entreprise et de réaliser des exercices d'application en lien avec l'entreprise.

En termes de pédagogie, j'apprécie particulièrement les enseignements sous forme de projets que je réalise en 4^e et 5^e année de pharmacie, mais aussi au niveau Master. Cette forme de pédagogie active et de formation par le problème permet aux étudiants d'appréhender une dimension pratique des connaissances théoriques, d'être plus responsables et de mettre en place une démarche scientifique.

Depuis 2016, j'interviens dans le master Erasmus Mundus international AquaCulture, Environment and Society (ACES). Cette opportunité m'a poussée à réaliser des enseignements en anglais auprès d'étudiants venant du monde entier et était un challenge que j'ai apprécié de relever.

Courant 2017, j'ai été contactée pour créer un bloc d'enseignements appelé « Sciences de l'environnement : les fondamentaux » dont je serai responsable, dans le cadre d'un projet de mastère Analyse du cycle de vie des navires (LICAS : Life Cycle Assessment of Ship) porté par l'école centrale de Nantes, qui ouvrira à la rentrée prochaine. Pour l'année 2018-2019, je suis nouvellement intervenue à l'école centrale lors de 3h de CM auprès des étudiants de 3^e année d'ingénieur généraliste, dans l'option « ingénierie de la transition écologique » afin de les initier à l'écotoxicologie.

En termes d'enseignement, comme de recherche, chaque année présente de nouveaux challenges et n'est pas identique aux précédentes. En contrepartie d'un grand investissement professionnel, ces activités sont une réelle source d'enrichissements tant d'un point de vue scientifique avec la création de nouveaux enseignements, que d'un point de vue relationnel avec le contact et le suivi des étudiants.

III. Recherche

III.1. Participation à des programmes scientifiques

Le récapitulatif des projets de recherche dans lesquels je me suis investie en tant que porteuse, responsable pour le laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) ou partenaire est donné dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Récapitulatif des participations à des programmes scientifiques

Année	Projet	Montant MMS (k€ TTC)	Durée (année)	Implication		
				Porteuse	Responsable MMS	Partenaire
2009	NanoReTox		4			X
2010	iCEINT		5			X
	ECELPE	56	3			X
2011	FishThyr	30	3			X
2012	ExperThyr	38	2			X
	RS2E	25	4			X
2013	NanoSalt	92	3			X
	NanoReg	40	5			X
2014	ECOTONES	42	4			X
2015	MiPIAqua	70	3		X	
	ContaBEL	7	2		X	
2016	TRANSFERT	5	2	X		
	ContaSed	5	2		X	
	EcotREE	83	4			X
2017	MytilOmics	53	2			X
2018	MICROBARET	5	1	X		

La frise chronologique des programmes scientifiques de recherches dans lesquels je me suis investie en tant que partenaire (gris clair), responsable pour MMS (gris foncé) et porteuse (noir) est présentée dans le Tableau 6 :

Tableau 6 : Frise chronologique des programmes de recherche

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Inter	NanoReTox			NanoReg					
	iCEINT								
Nationaux	ECELPE			NanoSalt			TRANSFERT	MICROBARET	
		FishThyr			ECOTONES				
			ExperThyr		MiPlAqua				
			RS2E				ContaSed		
						ContaBEL	MytilOmics		
							EcotREE		

III.1.1 En tant que porteuse du projet

- **MICROBARET** Contamination en microplastiques dans des bassins de rétention d'eaux de ruissellement urbaines
Appel d'Offre Interne (AOI) de l'Observatoire des Sciences de l'Univers de Nantes Atlantique (OSUNA) - **2018** - 5 k€
Collaboration : Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux (IFSTTAR) Nantes.
- **TRANSFERT** Evaluation du transfert de contaminants organiques de l'ancienne décharge de la Prairie de Mauves vers la Loire
AOI POLLUSOLS Pollution diffuse de la terre à la mer – **2016/2017** – 5 k€
Collaborations : IFSTTAR Nantes et Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) Nantes.

III.1.2 En tant que responsable scientifique pour MMS

- **ContaSed** Contamination des sédiments de l'estuaire de Loire en polluants organiques émergents
AOI OSUNA – **2016/2017** – 5 k€
Collaboration : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) Nantes
- **MiPIAqua** Approche combinée terrain/laboratoire pour l'évaluation de l'impact des microplastiques sur des organismes aquatiques d'intérêt socio-économique (moules, huîtres)
Financement Paris Scientifiques Régionaux – **2015/2018** – 70 k€
Collaborations : Institut des Molécules et des Matériaux du Mans (IMMM) et IFREMER Nantes
- **ContaBEL – pilote** Contaminants chimiques chez le Bar en Estuaire de Loire : étude pilote
Financement Agence de l'eau – **2015/2016** – 7 k€
Collaboration : IFREMER Nantes

III.1.3 En tant que partenaire

❖ Européens/Internationaux

- **NanoReg** A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials – Programme FP7 – **2013/2017**
- **iCEINT** international Consortium for the ENvironmental implication of NanoTechnology – GdRi international – **2010/2014**
- **NanoReTox** The reactivity and toxicity of engineered nanoparticles: risks to the environment and human health – Programme FP7 – **2009/2012**
- **IRISE** Impact de la Répétition des Incendies de Forêt Sur l'Environnement forestier méditerranéen – Forest Focus European Regulation– **2003/2008**

❖ Nationaux

- **MytilOmics** Approche métabolomique non ciblée pour l'étude de la mortalité des moules
Financement Syndicat mixte pour le développement de l'aquaculture et de la pêche en Pays de la Loire (SMIDAP) – **2017/2018** – 53 k€
- **EcotREE** Ecotoxicology of rare earth elements in aquatic systems
Financement ANR – **2016/2020** – 83 k€
Collaborations : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)
- **ECOTONES** Effet de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine
Financement GIP Seine Aval – **2014-2018** – 42 k€
Collaborations : Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), Agence de l'Eau Seine Normandie
- **NanoSalt** Nanomaterials across a salinity gradient : exposure and ecotoxicological effects within a life cycle perspective (production, usage, end of life) » Nanomatériaux à travers un gradient de salinité: exposition et effets ecotoxicologiques au cours de leur cycle de vie (production, utilisation, fin de vie)
Financement ANR – **2013/2016** – 92 k€
Collaborations : LIEC et Centre Européen de Recherche et Enseignement des Geosciences de l'Environnement (CEREGE)
- **RS2E** Réseau de suivi et de surveillance environnementale de l'OSUNA
Programme régional Pays de la Loire – **2012/2015** – 25 k€
Collaboration : Laboratoire de Planétologie et Géodynamique (LPG)
- **ExperThyr** L'estuaire de la Loire : quelle contamination et quels effets des perturbateurs thyroïdiens ?
Financement Syndicat mixte pour le développement de l'aquaculture et de la pêche en Pays de la Loire (SMIDAP) – **2012/2013** – 38 k€
- **FishThyr** Evaluation de l'impact de perturbateurs thyroïdiens chez les poissons
Financement fondation Genesia/UCO – **2011/2013** – 30 k€
- **ECELPE** Estimation de la contamination de l'estuaire de la Loire par des perturbateurs endocriniens
Financement SMIDAP – **2010/2012** – 56 k€

III.2. Collaborations scientifiques

- BRGM Nantes : Cécile Le Guern
- CEREGE (Université Aix-Marseille) : Mélanie Auffan
- Evandro Chagas Institute (Belém, Brésil) ; Environmental section : Marcelo de Oliveira Lima

- Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA; Belém, Brésil): Juliana Feitosa Felizzola
- IFREMER Nantes : Céline Tixier, Farida Akcha
- IFSTTAR Nantes : Béatrice Béchet
- IMMM (Université du Mans) : Fabienne Lagarde
- LABERCA : Bruno Le Bizec
- LCE : Pierre Doumenq, Laure Malleret, Pascal Wong-Wah-Chung
- LIEC (Université de Lorraine) : Laure Giamberini, Simon Devin
- LIENSs (Université de La Rochelle) : Hélène Thomas-Guyon
- LPG (Université de Nantes) : Thierry Lebeau
- National University of Sciences and Technology (Islamabad, Pakistan); department of environmental science: Hashmi Imran
- Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC ; Université de Mons, Belgique) : Samira Benali

III.3. Encadrement de la recherche

Le récapitulatif des encadrements d'étudiants en thèse et en M2 est donné dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Récapitulatif de l'encadrement de la recherche

Année	Nombre Master 2	Thèse		
		Nombre	Début	Fin
2012		1	Octobre 2012	Avril 2016
2013	1	1	Octobre 2013	Octobre 2016
2014	1			
2015	2	1	Janvier 2015	Juillet 2018
2016				
2017		1	Octobre 2017	En cours
2018	2			
TOTAL	6	4		

III.3.1 Doctorat

Un total de **4 encadrements de doctorants**, terminés (3) ou en cours (1).

- **Anne-Isaline Van Bohemen**

Étude des peptaibols des Trichoderma marins - Applications en contrôle biologique.

Financement : bourse ministérielle - **Octobre 2012/Avril 2016.**

Direction : 40% Pouchus Y.F.; encadrement : 30% Ruiz N. et **30% Zalouk-Vernoux A.**

Réalisations : A9 ; A20 ; CO17 ; P16

Devenir : enseignante au lycée de Basse Goulaine de septembre à décembre 2016/ Post-doc à l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles) de Gif sur Yvette de janvier à décembre 2017/ ATER à l'Université de Picardie Jules Verne de janvier à août 2018/ En formation « compétences pour l'entreprise » à l'école centrale de Nantes depuis octobre 2018.

- **Carole Bertrand**

Écotoxicité des nanomatériaux à travers un gradient de salinité et au cours de leur cycle de vie (production, utilisation, fin de vie).

Financement : ANR Nanosalt - **Octobre 2013/Octobre 2016**

Direction : 40% Mouneyrac C. ; codirection : 30% Giamberini L. (LIEC, Université de Lorraine) et co-encadrement : **30% Zalouk-Vernoux A.** (pour la 1^{ère} année, puis S. Devin pour la 2^e et L. Poirier pour la 3^e).

Réalisations : A21 ; CO15 ; CO19

Devenir : post-doc au LIEC à Metz (Université de Lorraine) de novembre 2016 à juin 2017/ CDI directeur d'études chez Eurofins à Niefern (Allemagne) depuis juillet 2017.

- **Nam Ngoc Phuong**

Développements analytiques pour la caractérisation et la quantification de la contamination en microplastiques des matrices sédimentaires et biologiques : application aux zones conchylicoles des Pays de la Loire.

Financement : bourse du gouvernement Vietnamien – **Janvier 2015/Juillet 2018** (4^e année financée)

Direction : 40% Herrenknecht C. ou Mouneyrac C. ; co-encadrement : 30% Poirier L. et **30% Zalouk-Vernoux A.**

Réalisations : A19 ; A22 ; A23 ; A24 ; CO18 ; CO22; CO23; CO24; CO25; P19, P23

Devenir : Employé dans la restauration

- **Marjorie Lortholario**

Les terres rares : exposition et bioaccumulation de deux espèces clés de l'écosystème estuarien ligérien, l'anguille européenne et le flet commun.

Financement : bourse ministérielle – **Octobre 2017/En cours**

Direction : 40% Herrenknecht C. ; co-encadrement : 30% Poirier L. et **30% Zalouk-Vernoux A.**

Réalisations : CO26

III.3.2 Master 2

Un total d'**encadrement de 6 étudiants en Master 2.**

- **Pierre Dubuisson** (M2 TE ; Université d'Angers ; 5 mois)

Caractérisation de la contamination des sédiments de l'estuaire de la Loire en certains perturbateurs endocriniens : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), métabolites de HAP, bisphénol A et alkylphénols (AP).

Financement : projet Experthyr - Janvier/juin 2013

Encadrement : 50% Poirier L., **50% Zalouk-Vernoux A.**

- **Nam Ngoc Phuong** (M2 CQPS ; 6 mois)

Mise au point d'une méthode d'analyse quantitative de la production des peptaïbols par les *Trichoderma* marins.

Financement du gouvernement du Vietnam - janvier/septembre 2014

Encadrement : **100% Zalouk-Vernoux A.**

Réalisations : A20 ; CO17

- **Fayza Zouaoui** (M2 TE ; Université du Mans ; 5 mois)
Étude du devenir de nanoparticules d'argent et de cérium, et leur bioaccumulation par *Scrobicularia plana* et *Corbicula fluminea* après exposition par voie directe et/ou trophique
Financement : ANR NanoSalt - Janvier/juin 2015
Encadrement : 50% Poirier L., **50% Zalouk-Vernoux A.**
- **Romain Naël** (M2 TE ; Université d'Angers ; 5 mois)
Contamination des sédiments de l'estuaire de Loire associée à son contexte géographique.
Financement : IUML - Mars/Août 2015
Encadrement : 50% Fattal P., **50% Zalouk-Vernoux A.**
- **Samuel Mounianman** (M2 TE ; Université du Mans ; 5 mois)
Étude de la contamination en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et en Microplastiques d'un bassin d'infiltration d'eaux de ruissellements urbains.
Financement OSUNA, projet MICROBARET - Février/juin 2018
Encadrement : **100% Zalouk-Vernoux A.**
- **Amina Khalid** (M2 ACES ; 5 mois)
A biomarker study to assess the potential health impacts of biodegradable microplastic using blue mussels (*Mytilus edulis*) as sentinel organism.
Février/juin 2018
Encadrement: 50% Poirier L., 50% **Zalouk-Vernoux A.**
Réalisations : P25

III.3.3 Autres encadrements

Un total de **6 étudiants en stage de M1 d'une durée de 2 à 4 mois** (Eloïse Victoire (2010), Cyrielle Castagné (2012), Pierre Dubuisson (2012), Claire Remy (2013), Eva Delatour (2014), Gwenaëlle Dufour (2015), Thomas Cogné (2017))

Un total de **6 étudiants en Stage d'Initiation à la Recherche (SIR)** d'un mois (Claire Thomann (2011), Anaïs Runcoat (2011), Claire Favreau (2013), Pantéa Charifi (2014), Blandine Latrobe (2016), Maxime Parette (2017)).

III.4. Expertise

III.4.1 Membre de jury de thèse

Un total de **4 participations à des jurys de thèse comme examinatrice**

- **M. Alikuddin Umasangaji.** « Contamination des calanques par les micropolluants organiques (Cortiou), zone côtière de Marseille, France ». Soutenue le 19/12/2018 à l'Université d'Aix-Marseille.
- **M. Ali Kadar.** « Évaluation de l'effet mélange sur la clairance hépatique humaine de pesticides appartenant à deux groupes de matières actives communément retrouvées dans l'alimentation française : développement analytique et études cinétiques ». Soutenue le 17/12/2018 à l'Université d'Aix-Marseille.
- **Mme Camille Grandclément.** « Degradation of organic micropollutants using a hybrid bioreactor ». Soutenue le 30/11/2017 à l'Université d'Aix-Marseille.

- **M. Sofiène Tlili.** « Approche multi-marqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du golfe de Tunis : étude des réponses biochimiques, physiologiques et cytologiques des mollusques bivalves exposés aux effluents des oueds ». Soutenue le 02/07/2012 à l'Université de Monastir.

III.4.2 Révisions d'articles scientifiques

Un total de **29 articles révisés** dans des journaux de rang A pour la plupart (Tableau 8). Les domaines concernés étaient relatifs à la chimie analytique et à l'écotoxicologie.

Tableau 8 : Récapitulatif des révisions d'articles scientifiques

Année	Nombre	Exemple de journaux
2011	5	Journal of Hazardous Materials (FI : 5,31) Geoderma (FI : 3,82) Organic Geochemistry (FI : 3,74)
2012	1	Geoderma (FI : 3,80)
2013	1	Plant and Soil (FI : 3,42)
2014	2	Chemistry and Ecology (FI : 1,41) Solid earth (FI : 1,02)
2015	2	Science of the Total Environment (FI : 4,42) International Environmental Analytical Chemistry (FI : 1,24)
2016	5	Environment International (FI : 7,09) Environmental Pollution (FI : 5,10) Environmental Research (FI : 4,38)
2017	8	Environmental Science & Technology (FI : 6,65) Science of the Total Environment (FI : 4,61) Chemosphere (FI : 4,43)
2018	5	Journal of Hazardous Materials (FI : 6,43) Environmental Pollution (FI : 4,36) Marine Pollution Bulletin (FI : 3,24)
TOTAL	29	

III.5. Bilan

Les avancées de mes connaissances, de mes compétences et de mes recherches scientifiques ont pu être possibles grâce aux différents projets dans lesquels j'étais impliquée en tant que porteuse, coordinatrice ou partenaire, soit un total de 13 nationaux et 4 internationaux. Au-delà des soutiens financiers matériels que procurent les projets, ces derniers ont été l'occasion de collaborer avec de nombreux scientifiques de différentes équipes de recherche, ce qui est particulièrement enrichissant d'un point de vue scientifique, relationnel, mais aussi personnel. En parallèle, les soutiens financiers humains sont également primordiaux, car sans le travail des doctorants et des stagiaires que j'encadre ou que j'ai pu encadrer, les avancées auraient été moindres. Mes activités de recherche bénéficient ou ont bénéficié du travail de 4 doctorants, 7 étudiants en M1, 6 en M2 et 6 en SIR, en contrepartie de quoi j'essaie au mieux de diriger les travaux de laboratoire, les acquisitions et traitements des données, la rédaction des rapports de stage ou manuscrits de thèse et la valorisation des résultats.

L'acceptation ou non du financement des réponses à appel à projets proposées aux différentes instances constitue une forme d'orientation des thématiques de recherche. Ainsi, il est parfois difficile de pouvoir approfondir certains axes de recherche qui nous semblent pertinents par manque de financement alors que d'autres projets sur de nouvelles thématiques plus attrayantes sont financés. Cela représente parfois une difficulté dans mon travail de recherche, car il faut sans cesse s'adapter au contexte environnemental. Ce contexte est par exemple rythmé par la mise en évidence de nouveaux contaminants représentant un risque et dont il faut en faire l'évaluation. Cette difficulté peut aussi être perçue comme une opportunité de diversité des sujets d'étude, mais cela implique un effort d'adaptation important. C'est ainsi que j'ai eu l'occasion de travailler sur un large panel de familles de contaminants de l'environnement : organiques, métalliques et plastiques, à l'état de trace ou non, dans des matrices environnementales issues de collectes *in situ* ou d'expérimentations *in vivo*.

Grâce au large éventail de techniques analytiques que j'ai abordé lors de mon doctorat, de mon poste d'ATER et depuis que je suis nommée à Nantes comme maître de conférences, j'ai maintenant une bonne vision d'ensemble sur la chimie de l'environnement au sens large. Cette expertise se traduit en partie par les sollicitations nombreuses des journaux scientifiques relatifs à mes domaines de recherche, que je ne peux malheureusement pas toutes satisfaire par manque de temps. Néanmoins, j'ai pu faire la révision de 26 articles proposés à publication par d'autres équipes. La fréquence s'est accentuée ces dernières années sur la thématique des microplastiques en plein essor. En sus des révisions d'articles, j'ai aussi pu apporter mon expertise lors de 4 jurys de thèse auquel j'ai eu le plaisir de participer en tant qu'examinatrice. Cet exercice est très formateur et permet de s'améliorer en tant qu'encadrant de thèse.

IV. Valorisation des travaux

Le récapitulatif de la valorisation de mes travaux de recherche sous la forme de publications ou de présentations orales et affichées est donné dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Récapitulatif de la valorisation des travaux de recherche

Année	Publications	Conférence invitée	Congrès et colloques			
			Nationaux Poster	Oral	Internationaux Poster	Oral
2007			1		2	2
2008			1			2
2009	2		2	1	2	1
2010					1	
2011	4			1		2
2012			2			1
2013	4				5	1
2014	4					1
2015	2				2	5
2016	5			3	1	2
2017		1			1	2
2018	3		2	2	3	
Total	24	1	8	7	17	19

IV.1. Articles scientifiques

Un total de **24 articles publiés** (14 en rang utile) et près de 820 citations qui me permettent d'atteindre un **H-index de 14**. Le facteur d'impact (IF) moyen des journaux dans lesquels les articles ont été publiés est de 3,32 et 87,5% d'entre eux sont dans le 1^{er} quartile.

Mon nom est indiqué en gras et le nom des étudiants de M2 et de doctorat que j'ai encadrés sont soulignés.

Les 5 publications les plus représentatives de mon travail de recherche sont surlignées de gris.

Les facteurs d'impact (IF) et le quartile (Q) sont ceux de l'année de publication et le nombre de citations est arrêté au 27/01/2019.

- (A1) **Vergnoux A**, Guiliano M, Le Dréau Y, Kister J, Dupuy N, Doumenq P. 2009. Monitoring of the evolution of an industrial compost and prediction of some compost properties by NIR spectroscopy. *Sci. Total Environ.* 407, 2390-2403.
IF : 3,23 ; citations : 70 ; Q1 ; doi:10.1016/j.scitotenv.2008.12.033
- (A2) **Vergnoux A**, Dupuy N, Guiliano M, Vennetier M, Théraulaz F, Doumenq P. 2009. Fire impact on forest soils evaluated using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta.* 80, 39-47.
IF : 3,29 ; citations : 15 ; Q1 ; doi:10.1016/j.talanta.2009.06.028
- (A3) **Vergnoux A**, Allari E, Sassi M, Thimonier J, Hammond C, Clouzot L. 2011. A multidisciplinary investigation of aquatic pollution and how to minimize it. *J. Biol. Educ.* 45, 37-49.
IF : 0,39 ; citations : 3 ; Q4 ; doi: 10.1080/00219266.2011.537839

- (A4) **Vernoux A**, Guiliano M, Di Rocco R, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P. 2011. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environ. Res.* 111, 205-214.
IF : 4,58 ; citations : 56 ; Q1 ; doi:10.1016/j.envres.2010.03.005
- (A5) **Vernoux A**, Guiliano M, Di Rocco R, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P. 2011. Effects of forest fires on Water Extractable Organic Matter and Humic Substances from Mediterranean soils: UV-Vis and Fluorescence spectroscopy approaches. *Geoderma*. 160, 434-443.
IF : 3,82 ; citations : 66 ; Q1; doi:10.1016/j.geoderma.2010.10.014
- (A6) **Vernoux A**, Malleret L, Asia L, Doumenq P, Theraulaz F. 2011. Impact of forest fires on PAH level and distribution in soils. *Environ. Res.* 111, 193-198.
IF : 4,58 ; citations : 78 ; Q1; doi:10.1016/j.envres.2010.01.008
- (A7) Buffet PE, **Zalouk-Vernoux A**, Châtel A, Berthet B, Métais I, Perrein-Ettajani H, Poirier L, Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Risso-De Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2013. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusk *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 470-471, 1151-1159.
IF : 3,84 ; citations : 97 ; Q1 ; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114
- (A8) Blanchet-Letrouvé I, Lafont AG, Poirier L, Baloché S, **Zalouk-Vernoux A**, Dufour S, Mouneyrac C. 2013. Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from Loire estuary (France). *Ecotox. Environ. Safe.* 97, 103-113.
IF : 2,48 ; citations : 7 ; Q2 ; doi:10.1016/j.ecoenv.2013.07.019
- (A9) Carroux A, Van Bohemen AJ, Roullier C, Robiou du Pont T, Vansteelandt M, Bondon A, **Zalouk-Vernoux A**, Pouchus YF, Ruiz N. 2013. Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*. *Chem. Biodivers.* 10, 772-786.
IF : 1,80 ; citations : 16 ; Q2; doi: 10.1002/cbdv.201200398
- (A10) Buffet PE, Richard M, Caupos F, **Vernoux A**, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2013. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 1620-1628.
IF : 5,48 ; citations : 110 ; Q1 ; doi:10.1021/es303513r
- (A11) Blanchet-Letrouvé I, **Zalouk-Vernoux A**, Vénisseau A, Le Bizec B, Elie P, Herrenknecht C, Mouneyrac C, Poirier L. 2014. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from Loire estuarine continuum: Spatial and biological variabilities. *Sci. Total Environ.* 472, 562-571.
IF : 4,57 ; citations : 31 ; Q1 ; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.037

- (A12) Mouneyrac C, Buffet PE, Poirier L, **Zalouk-Vernoux A**, Guibbolini M, Risso-de Faverney C, Gilliland D, Berhanu D, Dybowska A, Châtel A, Perrein-Ettajni H, Pan JF, Thomas-Guyon H, Reip P, Valsami-Jones E. 2014. Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 7899-7912.
IF : 1,98 ; citation : 42 ; Q1 ; doi:10.1007/s11356-014-2745-7
- (A13) Buffet PE, Poirier L, **Zalouk-Vernoux A**, Lopes C, Amiard JC, Gaudin P, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Perrein-Ettajni H, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2014. Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. Chemosphere. 100, 63-70.
IF : 3,34; citations: 31; Q1 ; doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.069
- (A14) Couderc M, Gandar A, Kamari A, Allain Y, **Zalouk-Vernoux A**, Herrenknecht C, Le Bizec B, Mouneyrac C, Poirier L. 2014. Neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol exposure during gestational and breastfeeding period on F1 rats. Neurotoxicology. 44, 237-249.
IF : 3,38 ; citations : 5 ; Q1 ; doi:10.1016/j.neuro.2014.07.002
- (A15) Buffet PE, **Zalouk-Vernoux A**, Poirier L, Lopes C, Risso-de-Faverney C, Guibbolini M., Gilliland D, Perrein-Ettajani H, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2015. Cadmium sulfide quantum dots induce oxidative stress and behavioral impairments in the marine clam *Scrobicularia plana*. Environ. Toxicol. Chem. 34, 1695-1664.
IF : 2,76 ; citations : 14 ; Q1 ; doi: 10.1002/etc.2967
- (A16) Couderc M, Poirier L, **Zalouk-Vernoux A**, Kamari A, Blanchet-Letrouvé I, Marchand P., Vénisseau A, Veyrand B, Mouneyrac C, Le Bizec B. 2015. Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France. Sci. Total Environ. 505, 199-215.
IF : 4,42 ; citations : 25 ; Q1 ; doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.053
- (A17) Couderc M, Gandolfi F, **Zalouk-Vernoux A**, Beyeler N, Malleret L, Ambidina I, Kamari A, Blanchet-Letrouvé I, Mouneyrac C, Hamers T, Poirier L. 2016. Levels and distributions of organic pollutants in subtidal sediments from the Loire estuary: are there any relationships with TTR-binding activity? J. Sea Res. 118, 59-68.
IF : 1,89 ; citations : 1 ; Q1 ; doi:10.1016/j.seares.2016.07.005
- (A18) Couderc M, Marchand J, **Zalouk-Vernoux A**, Kamari A, Moreau B, Blanchet-Letrouvé I, Le Bizec B, Mouneyrac C, Poirier L. 2016. Thyroid endocrine status of wild European eels (*Anguilla anguilla*) in the Loire (France). Relationships with organic contaminant body burdens. Sci. Total Environ. 550, 391-405.
IF : 4,42 ; citations : 7 ; Q1; doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.136
- (A19) Phuong NN, **Zalouk-Vernoux A**, Poirier L, Kamari A, Châtel A, Mouneyrac C, Lagarde F. 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environ. Pollut. 211, 111-123.
IF : 5,10 ; citations : 102 ; Q1 ; doi:10.1016/j.envpol.2015.12.035

- (A20) Van Bohemen AI, **Zalouk-Vernoux A**, Poirier L, Phuong NN, Inguibert N, Ben Haj Salah K, Ruiz N, Pouchus YF. 2016. Development and validation of LC–MS methods for peptaibol quantification in fungal extracts according to their lengths. *J. Chrom. B*, 1009–1010, 25-33.
IF : 2,21 ; citations : 5 ; Q1 ; doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.039
- (A21) Bertrand C, **Zalouk-Vernoux A**, Giambérini L, Poirier L, Devin S, Labille J, Perrein-Ettajani H, Pagnout C, Châtel A, Levard C, Auffan M, Mouneyrac C. 2016. The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2550–2561.
IF : 2,95 ; citations : 12 ; Q1 ; doi:10.1002/etc.3428
- (A22) Phuong NN, **Zalouk-Vernoux A**, Kamari A, Mouneyrac C, Amiard F, Poirier L, Lagarde F. 2018. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 6135-6144.
IF : 2,74 ; citations : 11 ; Q1 ; doi:10.1007/s11356-017-8862-3
- (A23) Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, **Zalouk-Vernoux A**. 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or lifestyle? *Mar. Pollut. Bull.* 129, 664-674.
IF : 3,24 ; citations : 17 ; Q1 ; doi:10.1016/j.marpolbul.2017.10.054
- (A24) Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, Kamari A, **Zalouk-Vernoux A**. 2018. Microplastic abundance and characteristics in French Atlantic coastal sediments using a new extraction method. *Env. Pollut.* In press
IF : 4,36 ; citations : 0 ; Q1 ; doi:10.1016/j.envpol.2018.08.032

IV.2. Ouvrage

Un ouvrage sur mes activités d'enseignement.

- (O1) Barnathan G, Couzinet-Mossion A, Ourliac-Garnier I, Wielgosz-Collin G, **Zalouk-Vernoux A**. *Rappels de cours et exercices corrigés de chimie générale (Questions à Items Multiples)*. Parution : 11-09-2012. Editeur : ELLIPSES. Collection : PACES

IV.3. Conférence sur invitation personnelle

Une invitation personnelle à la participation à un congrès international.

- (CIP) Monitoring of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*) and Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) of the French Atlantic coast.
Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, **Zalouk-Vernoux A**
II International scientific meeting of Institute Evandro Chagas, 27/10/2017, Belém, Brésil.

IV.4. Communications orales

Un total de **26 communications orales** lors de congrès nationaux (7) ou internationaux (19) dont **12 en tant qu'oratrice**.

Mon nom est indiqué en gras, le nom des étudiants de M2 et de doctorat que j'ai encadrés sont soulignés et le nom des orateurs est en italique.

- (CO1) Effect of forest fires on the WEOM and PAHs in the soils.
Vernoux A, Malleret L, Théraulaz F, Doumenq P.
International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field (IX ISAMEF), 3-5/10/2007, Palma, Espagne.
- (CO2) Effect of forest fires on the WEOM and PAHs in the soils.
Vernoux A, Malleret L, Théraulaz F, Doumenq P.
International Symposium Environmental Science and Technology (2007 ISEST), 13-16/11/2007, Pékin, Chine.
- (CO3) Quantitative and qualitative impact of forest fires on soil organic matter.
Vernoux A, Domeizel M, Di Rocco R, Théraulaz F, Asia L, Guiliano M, Doumenq P.
International Conference on Environmental Science and Technology (2008 ICEST), 28-31/07/2008, Houston, USA.
- (CO4) Modification of soil PAHs level and distribution profiles by forest fires.
Vernoux A, Domeizel M, Théraulaz F, Malleret L, Doumenq P.
International Conference on Environmental Science and Technology (2008 ICEST), 28-31/07/2008, Houston, USA.
- (CO5) Impact quantitatif et qualitatif des feux de forêt sur les substances humiques du sol.
Vernoux A, Domeizel M, Di Rocco R, Guiliano M, Théraulaz F, Doumenq P.
Colloque Matières Organiques et Environnement du Réseau Matières Organiques, 25-28/01/2009, Sainte Maxime, France.
- (CO6) Evaluation of the condition of forest soils affected by different fire recurrences using NIRS coupled to chemometric methods.
Vernoux A, Guiliano M, Dupuy N, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P.
International Meeting of Fire Effects on Soils Properties (FESP II), 11-15/02/2009, Marmaris, Turquie.
- (CO7) Impact of forest fires on soil PAH levels and distribution profiles.
Doumenq P, **Vernoux A**, Asia L, Malleret L.
Université Genderal Soerdirman (UNSOED), 21/11/2011, Indonésie.
- (CO8) Sedimentary hydrocarbon origin elucidation; How far can we go with simple molecular tools?
Doumenq P, Syakti AD, **Vernoux A**, Asia L, Malleret L.
Institut Pertanian BOGOR (IPB), 23/11/2011, Indonésie.

- (CO9) Peptaïbols et chimiotaxonomie des *Trichoderma* en milieu marin.
Ruiz N, Robiou du Pont T, Joubert Y, Poirier L, **Vergnoux A**, Bissett J, Pouchus YF.
Assemblée générale BioChiMar Journées 2011, 27-29/06/2011, Paris, France.
- (CO10) A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Nereis diversicolor*).
Buffet PE, Richard M, Caupos F, **Vergnoux A**, Perrein-Ettajani H, Thomas-Guyon H, Luna-Acosta A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Risso C, Guibbolini M, Reip P, Valsami-Jones E, Mouneyrac C.
22nd V.M. Goldschmidt Conference, 24-29/06/2012, Montréal, Canada.
- (CO11) Fate and toxicity effects of metal-bearing nanoparticles on two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Nereis diversicolor*.
Buffet PE, Poirier L, **Vergnoux A**, Pan JF, Berhanu D, Dybowska A, Châtel A, Amiard-Triquet C, Richard M, Thomas-Guyon H, Perrein-Ettajani H, Risso C, Guibbolini M, Reip P, Gililand D, Valsami-Jones E, *Mouneyrac C*.
8th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, 3-5/07/2013, Aix-en-Provence, France.
- (CO12) The mesocosm approach to estimate the fate, bioaccumulation and toxicity of silver nanoparticles on two endobenthic species: the bivalve mollusk *Scrobicularia plana* and the worm *Nereis diversicolor*.
Zalouk-Vergnoux A, Buffet PE, Châtel A, Berthet B, Métais I, Perrein-Ettajani H, Poirier L, Thomas-Guyon H, Risso-de-Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 11-15/05/2014, Bâle, Suisse.
- (CO13) Aromatase and vitellogenin mRNA expression in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France): relationships with PCB contamination.
Blanchet-Letrouvé I, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Lafont AG, Baloché S, Dufour S, Mouneyrac C
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7/05/2015, Barcelone, Espagne.
- (CO14) Multi-contamination related to variations in thyroid endocrine status of wild European eels (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France).
Couderc M, Marchand J, **Zalouk-Vergnoux A**, Kamari A, Moreau B, Blanchet-Letrouvé I, Le Bizec B, Mouneyrac C, *Poirier L*.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7/05/2015, Barcelone, Espagne.

- (CO15) Influence of salinity on fate and behavior of silver-based manufactured nanomaterials and toxicity effects toward two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*.
Bertrand C, Devin S, Mouneyrac C, Auffan M, Châtel A, Koehle-Divo V, Pagnout C, Pain-Devin S, Pariat A, Perrein-Ettajani H, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Giambérini L.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7/05/2015, Barcelone, Espagne.
- (CO16) Toxicity effects of metal-based nanoparticles towards two estuarine invertebrates: *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor*.
Châtel A, Perrein-Ettajani H, Bruneau M, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Mouneyrac C.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 1-5/11/2015, Salt Lake City, USA.
- (CO17) Development and validation of an LC-MS based method for quantification of peptaibols in marine-derived *Trichoderma* crude extracts.
Van Bohemen AI, Ruiz N, Phuong NN, Poirier L, Inguibert N, Pouchus YF, **Zalouk-Vergnoux A**.
Marine Fungal Natural Products (MaFNaP), 22-24/07/2015, Nantes, France.
- (CO18) Comparison of tissue preparation procedures to perform microplastic analysis; application to mussels (*Mytilus edulis*) from the Atlantic coast (Pays de la Loire, France).
Phuong NN, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L, Kamari A, Rouxel J, Sussarellu R, Akcha F, Châtel A; Mouneyrac C, Lagarde F.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 22-26/05/2016, Nantes, France.
- (CO19) Cross effect of salinity and ceria nanoparticles on two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*: multibiomarker assessment.
Bertrand C, Devin S, Mouneyrac C, Auffan M, Châtel A, Koehle-Divo V, Pagnout C, Pain-Devin S, Pariat A, Perrein-Ettajani H, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Giambérini L.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 22-26/05/2016, Nantes, France.
- (CO20) Qualité des sédiments de l'estuaire de la Loire : contamination par les contaminants organiques type perturbateurs thyroïdiens et état de santé de la macrofaune.
Couderc M, Poirier L, Métais I, Gandolfi F, Perrein-Ettajani H, **Zalouk-Vergnoux A**, Malleret L, Châtel A, Kamari A, Mouloud M, Gilet P, Hamers T, Mouneyrac C.
Société Française d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 29-30/06/2016, Reims, France.

- (CO21) Mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité des nanoparticules métalliques chez deux invertébrés marins : *Scrobicularia plana* et *Hediste diversicolor*.
Châtel A, Buffet PE, Perrein-Ettajani H, Bruneau M, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Mouneyrac C.
Société Française d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 29-30/06/2016, Reims, France.
- (CO22) Quelle adéquation entre les microplastiques trouvés dans l'environnement et ceux utilisés en laboratoire?
Phuong NN, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L, Kamari A, Mouneyrac C, Lagarde F.
Prix de la meilleure présentation du jeudi
Forum ECOTOX 2016 – fondation de coopération scientifique Rovaltain, 11-13/10/2016, Alixan, France.
- (CO23) Monitoring of microplastics in Japanese oysters (*Crassostrea gigas*) of the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France)
Phuong NN, **Zalouk-Vergnoux A**, Kamari A, Rouxel J, Sussarellu R, Akcha F, Châtel A, Mouneyrac C, Poirier L, Lagarde F.
International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS), 14-18/05/2017, Galway, Irelande.
- (CO24) Monitoring of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France)
Phuong NN, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L, Kamari A, Rouxel J, Sussarellu R, Akcha F, Châtel A, Mouneyrac C, *Lagarde F*.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 8-11/05/2017, Bruxelles, Belgique
- (CO25) Contamination en microplastiques des huitres, des moules et des sédiments de la baie de l'Aiguillon (Pays De La Loire, France)
Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, **Zalouk-Vergnoux A**.
Workshop Polymères et Océans, 15-17/01/2018, Montpellier, France
- (CO26) Bioaccumulation of rare earth elements in two sentinel species of the Loire estuary: the European eel (*Anguilla anguilla*) and the European flounder (*Platichthys flesus*)
Lortholary M, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L.
Journée du GDR Ecotoxicologie Aquatique, 4-5/12/2018, Lyon, France

IV.5. Communications affichées

Un total de **25 présentations par affiche** lors de congrès nationaux (8) ou internationaux (17) dont **10 en tant qu'oratrice**.

Mon nom est indiqué en gras, le nom des étudiants de M2 et de doctorat que j'ai encadrés sont soulignés et le nom des orateurs est en italique.

- (P1) Effet des feux de forêt sur la teneur en carbone organique et en HAP des sols.
Vergnoux A, Asia L, Michaud F, Malleret L, Théraulaz F, Doumenq P.
Société Française de Chimie (SFC), le 24 mai 2007, Avignon, France.

- (P2) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as indicators of forest fire: comparison of levels and distributions between burned and unburned soils.
Vergnoux A, Malleret L, Théraulaz F, Doumenq P.
International Symposium for Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC21), 5-10/08/2007, Trondheim, Norvège (5-10/08/07).
- (P3) Étude de l'impact d'un feu de forêt sur la matière organique extractible à l'eau, le carbone organique total du sol et les éléments nutritifs.
Vergnoux A, Domeizel M, Inogamdjanova S, Théraulaz F.
International Humic Substances Society (8^e colloque IHSS), 27-28/11/07, Lyon, France.
- (P4) Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques indicateurs de feux de forêt: teneurs et distributions dans des sols brûlés et témoins.
Vergnoux A, Malleret L, Asia L, Théraulaz F, Doumenq P.
Congrès annuel de l'Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement, 18-19/03/08, Aix-en-Provence, France
- (P5) Évaluation de l'impact des feux de forêt sur les sols par spectroscopie proche infrarouge et chimiométrie.
Vergnoux A, Guiliano M, Dupuy N, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P.
Colloque Matières Organiques et Environnement du Réseau Matières Organiques, 25-28/01/2009, Sainte Maxime, France.
- (P6) Total organic carbon and infrared changes of humic substances from Mediterranean burned soils.
Vergnoux A, Guiliano M, Di Rocco R, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P. Prix du meilleur poster.
International Meeting of Fire Effects on Soils Properties (FESP II), 11-15/02/2009, Marmaris, Turquie.
- (P7) Levels and distributions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: determination of an indicator of forest fires.
Vergnoux A, Malleret L, Asia L, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P.
International Meeting of Fire Effects on Soils Properties (FESP II), 11-15/02/2009, Marmaris, Turquie.
- (P8) Évaluation de l'impact des feux de forêt sur les sols par spectroscopie proche infrarouge et chimiométrie.
Vergnoux A, Guiliano M, Dupuy N, Domeizel M, Théraulaz F, Doumenq P.
Société Française de Chimie (SFC), 16/04/09, Marseille, France.
- (P9) Chemotaxonomic relevance of peptaibol fingerprints for the identification of marine-derived *Trichoderma* strains.
Ruiz N, Robiou du Pont T, Joubert Y, Poirier L, **Vergnoux A, Grovel O, Bissett J, Pouchus YF.**
13th International Symposium on Marine Natural Products (MaNaPro XIII), 17-22/10/2010, Phuket, Thaïlande.

- (P10) Perturbations thyroïdiennes mises en évidence dans l'eau et les sédiments de l'estuaire de la Loire par tests cellulaires PC-DR-LUC.
Couderc M, Bimbot M, Poirier L, **Vernoux A**, Karolak S, Herrenknecht C, Levi Y, Le Bizec B, Mouneyrac C.
ECOBim, 5-8/06/2012, Reims, France.
- (P11) Présence de perturbateurs endocriniens et cas d'intersexe chez le bivalve *Scrobicularia plana* dans 13 estuaires du Nord-Ouest de la France.
Fossi Tankoua O, Perisi F, Amiard-Triquet C, Berthet B, Aït-Aïssa S, LeMenach K, **Vernoux A**, Budzinski H.
ECOBim, 5-8/06/2012, Reims, France.
- (P12) Dioxin-like, non-dioxyn-like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: spatial and biological variabilities.
Blanchet-Letrouvé I, Zalouk-Vernoux A, Vénisseau A, Couderc M, Le Bizec B, Elie P, Herrenknecht C, Mouneyrac C, Poirier L.
Pollutant responses in marine organisms (PRIMO), 5-8/05/2013, Faro, Portugal.
- (P13) Assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and perfluorinated compounds (PFCs) in two fish species, *Anguilla anguilla* and *Platyctys flesus*, from the Loire estuary: correlation with size, sex, geographic locations and thyroid effects.
Couderc M, Poirier L, Zalouk-Vernoux A, Blanchet-Letrouvé I, Kamari A, Herrenknecht C, Marchand P, Mouneyrac C, Le Bizec B.
Pollutant responses in marine organisms (PRIMO), 5-8/05/2013, Faro, Portugal.
- (P14) Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire Estuary (France).
Blanchet-Letrouvé I, Lafont AG, Poirier L, Baloché S, Zalouk-Vernoux A, Dufour S, Mouneyrac C.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 12-16/06/2013, Glasgow, UK.
- (P15) Assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), perfluorinated alkylated substances (PFAs) in European eels (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary.
Couderc M, Poirier L, Zalouk-Vernoux A, Blanchet-Letrouvé I, Kamari A, Cariou R, Vénisseau A, Veyrand B, Marchand P, Mouneyrac C, Le Bizec B.
Dioxyn 2013 Symposium, 25-30/08/2013, Daegu, République de Corée.
- (P16) Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*.
Van Bohemen AI, Carroux A, Roullier C, Zalouk-Vernoux A, Pouchus YF, Ruiz N.
14th international symposium on Marine Natural Products (MaNaPro), 15-20/09/2013, La Toja, Espagne.

- (P17) Occurrence of PFAS in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France).
Couderc M, Poirier L, **Zalouk-Vernoux A**, Kamari A, Blanchet-Letrouvé I, Marchand P, Vénisseau A, Veyrand B, Mouneyrac C, Le Bizec B.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7/05/2015, Barcelone, Espagne.
- (P18) Fate of PCBs during developmental and sexual maturation of European eel (*Anguilla anguilla*).
Blanchet-Letrouvé I, Couderc M, **Zalouk-Vernoux A**, Elie P, Herrenknecht C, Dufour S, Le Bizec B, Mouneyrac C, *Poirier L*.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7/05/2015, Barcelone, Espagne.
- (P19) Development of analytical procedure for microplastic analysis in biological tissues: application to mussels (*Mytilus edulis*) from the Atlantic coast (Pays de la Loire, France).
Phuong NN, **Zalouk-Vernoux A**, Poirier L, Kamari A, Rouxel J, Sussarellu R, Akcha F, Châtel A, *Mouneyrac C*, Lagarde F.
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 6-10/11/2016, Orlando, USA.
- (P20) Screening strategy to select new fungal biocontrol products against plant diseases.
Bastide F, **Zalouk-Vernoux A**, Ruiz N, Pouchus YF, Simoneau P, Bonneau C, Bryone F, Guillemette T
1st International Symposium on plant bioprotection sciences and technologies (Plant BioProtech), 27-30/06/2017, Reims, France.
- (P21) Study of new fungal biocontrol products and their secondary metabolites against plant diseases.
Bastide F, **Zalouk-Vernoux A**, Ruiz N, Pouchus YF, Simoneau P, Bonneau C, Bryone F, Profizzi C, Cadiou M
12^{es} Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie - Journées Jean Chevaugnon 2018, 15-19/01/2018, Aussois, France.
- (P22) Impact of an old landfill on the organic contamination of surface and groundwater: From landfill to the Loire River.
Zalouk-Vernoux A, Poirier L, Augris P, Flahaut B, Le Guern C, Béchet B, *Négrel P*
European Geosciences Union (EGU), General Assembly 2018, 8-13/04/2018, Vienne, Autriche.
- (P23) Assessment of the microplastic contamination in sediments from the French Atlantic coast.
Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, Kamari A, *Dénier M*, **Zalouk-Vernoux A**
Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 13-17/05/2018, Rome, Italie.

- (P24) The NABUCO project: a search for new marine biocontrol agents against plant diseases. Ruiz N, Bastide F, Michaud A, Roullier C, **Zalouk-Vernoux A**, Pouchus YF, Simoneau P, Bonneau C, Bryone F, Letousey P, Profizi C, Cadiou M, Guillemette T
3^e Symposium international AFERP-STOLON, 18-20/07/2018, Rennes, France.
- (P25) Évaluation des effets potentiels de microplastiques biodégradables sur une espèce sentinelle : la moule bleue (*Mytilus edulis*).
Khalid A, Poirier L, Benali S, Mincheva R, Raquez JM, Bertrand S, **Zalouk-Vernoux A**
Forum Santé, Environnement & Molécules SEM 2018 – fondation de coopération scientifique Rovaltain, 11-13/10/2018, Alixan, France.

IV.6. Bilan

Les résultats de recherche obtenus pendant mon M2 et mon doctorat ont été valorisés sous la forme de 6 publications scientifiques, 9 présentations orales et 8 présentations affichées. Puis, mon implication dans les différentes thématiques étudiées au sein de l'équipe ECEm du laboratoire MMS, en tant qu'ATER et maître de conférences, s'est traduite en partie par la publication de 18 articles scientifiques, la présentation de 17 communications orales et 17 communications affichées. Les travaux publiés (A8), (A11), (A14), (A16), (A17) et (A18) sont représentatifs de mes activités en termes d'évaluation de la contamination de l'environnement par des polluants organiques à l'état de traces. Quant aux publications (A7), (A10), (A12), (A13), (A15), et (A21), elles traitent d'expositions d'espèces modèles (*Scrobicularia plana* et/ou *Hediste diversicolor*) à des nanoparticules métalliques (Cd, Ag ou Cu), en aquariums ou mésocosmes, à différentes salinités, afin de déterminer le devenir de ces contaminants émergents et leurs effets sur des organismes endobenthiques. Depuis peu, une nouvelle thématique est en plein essor dans le paysage de l'écotoxicologie et par conséquent au laboratoire ; il s'agit des microplastiques. Cette thématique me tient particulièrement à cœur et des développements analytiques ont été réalisés et validés afin de permettre l'évaluation de la contamination en microplastiques des sédiments et des bivalves des zones de production conchylicole de la région Pays de la Loire. Les résultats ont été publiés dans les articles (A19), (A22), (A23) et (A24). Une autre équipe du laboratoire MMS (ChiChaMVa : chimiodiversité des champignons marins et valorisations) a fait appel à mes compétences en modélisation, statistiques, analyse quantitative et validation de méthodes pour compléter leur expertise en analyse qualitative de la production de peptaïbols par des souches de *Trichoderma* en vue d'utiliser ces molécules et ces champignons comme outil chimiotaxonomique et agents de biocontrôle respectivement. Dans ce contexte, les publications (A9) et (20) ont été réalisées.

Parmi les différentes publications réalisées, les 5 qui me semblent les plus importantes dans mes activités de recherche à ce jour sont les suivantes : (A10), (A16), (A19), (A20) et (A23). Elles traitent, d'une façon générale, de la contamination environnementale, du devenir et des effets de différents contaminants émergents organiques, métalliques et plastiques et montrent une certaine capacité d'adaptation. Mon rang dans la publication (A23) et le facteur d'impact de plus de 5 du journal dont est issue la revue d'articles (A19) traduisent une certaine cohérence entre mon implication forte sur la thématique des microplastiques et une reconnaissance scientifique. La publication (A20) montre aussi que je suis capable de travailler

dans d'autres domaines que l'écotoxicologie en utilisant mes compétences en chimie analytique et validation de méthodes d'analyse.

Afin de faire apparaître les points forts de mes travaux de recherche, en termes de publications scientifiques, voici quelques représentations des données :

- **Le facteur d'impact médian des journaux dont mes publications sont issues est de 3,32 avec un minimum de 0,39 et un maximum de 5,48.** Comme le montre la Figure 1 ci-contre, qui représente la répartition de mes travaux de recherche selon le facteur d'impact de leur journal, plus de la moitié ont **un facteur d'impact supérieur à 3** (61%).

Facteur d'impact

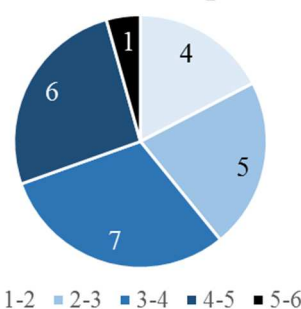


Figure 1: Répartition publications en fonction du facteur d'impact du journal

- La plupart des journaux dans lesquels mes articles ont été publiés se positionnent dans le **1^{er} quartile de leur domaine scientifique** (21/24 soit 87,5%) comme le montre la Figure 2.

Quartile du journal

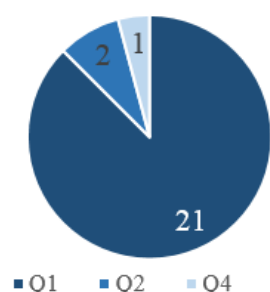


Figure 2: Répartition des publications en fonction du quartile du journal

- Pour illustrer la quantité et la qualité de travaux de recherche publiés, la Figure 3 ci-dessous montre le nombre de publications et de citations en fonction des années qui me confère un **H-index de 14**.



Figure 3: Évolution du nombre de publications et de citations au cours du temps. Graphique issu de www.scopus.com avec le nom Aurore Vergnoux, le 27/01/19

En moyenne sur les 4 dernières années, **ma production de publication annuelle est de 2,7** avec des variations en fonction des années. **Quant aux citations, elles sont en progression au cours du temps.**

- La Figure 4 ci-après, représentant le rang de mon nom parmi les auteurs des publications, montre que mon nom est souvent en **rang utile (1^{er}, 2^e ou dernier) pour plus de la moitié des publications (63%).**

Rang parmi les auteurs

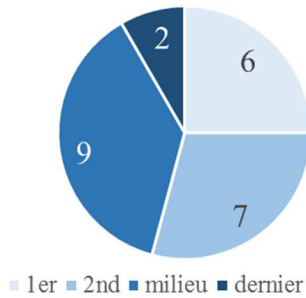


Figure 4: Répartition des publications en fonction du rang de mon nom parmi les auteurs

- De plus, la totalité des publications dont je suis coauteure fait apparaître d'autres auteurs issus de différents laboratoires, ce qui traduit une réelle **volonté de travailler en collaboration et un certain rayonnement scientifique.**

Pour finir, j'ai eu l'honneur d'être invitée par l'IEC (Institut Evandro Chagas) en octobre 2017, à Belém au Brésil, pour présenter nos travaux sur les microplastiques dans les bivalves de la côte Atlantique française à l'occasion d'un meeting scientifique. Ce fut une très bonne opportunité pour initier des collaborations outre Atlantique. Une demande de bourse de thèse a été faite auprès de la CAPES (coordination pour le perfectionnement du personnel de l'enseignement supérieur, agence qui dépend du Ministère de l'Éducation) par l'Université fédérale de Para, courant janvier 2018, afin qu'une étudiante brésilienne (M^{elle} Brenda Natasha Souza Costa) puisse passer une année de thèse en France pour évaluer la contamination en microplastiques de sédiments et d'organismes aquatiques prélevés près d'une décharge à ciel ouvert. La demande a été acceptée et l'étudiante est actuellement au laboratoire pour conduire ses expériences sous ma responsabilité. Nous pensons déposer un projet pour une collaboration de recherche auprès du programme CAPES/COFECUB en juin de l'année prochaine.

Deuxième partie :

Synthèse des travaux de recherche

**ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DE
L'ENVIRONNEMENT PAR LES HAP,
LES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES ET
LES MICROPLASTIQUES**

I. Préambule

Les travaux de recherche de l'équipe ECEm de MMS à laquelle j'appartiens visent à accroître les connaissances et à développer des outils d'évaluation en vue d'améliorer la gestion du risque lié à l'exposition des organismes des réseaux trophiques marins et estuariens à des contaminants émergents (nanoparticules, perturbateurs endocriniens...). Cette thématique de recherche répond à une forte demande sociétale. Les recherches en écotoxicologie sur ces nouveaux composés constituent en effet un enjeu prioritaire pour le grand public, la communauté scientifique, le secteur industriel et les collectivités loco-régionales et nationales.

La question qui découle de ce constat est : comment se positionne la chimie environnementale par rapport à l'écotoxicologie ?

L'accroissement démographique et les développements technologiques mènent à une pression anthropique sur les écosystèmes en constante augmentation. Les activités agricoles, industrielles, la production énergétique, l'urbanisme, etc. font qu'une très grande diversité de composés organiques ou minéraux est rejetée dans l'environnement, entraînant une potentielle distribution planétaire et menant à une exposition des organismes vivants à ces composés. La présence de ces composés dans l'environnement peut être associée à des enjeux socio-économiques forts, car ils peuvent représenter des risques pour la santé, engendrer des coûts économiques importants (réhabilitation de sites pollués, dédommagements, mise en conformité d'installation, substitution, etc.) et sont au cœur des orientations politiques (lois, aménagements, sensibilisation, etc.). Pour l'Europe, les principes fondamentaux sont : (i) le principe du pollueur-payeur, (ii) le préventif prime sur le curatif et (iii) le principe de précaution. Cependant, dans le but de reposer sur ces principes fondamentaux, la réglementation et les décideurs politiques doivent s'appuyer sur des évaluations du risque environnemental fiables. Le risque environnemental R est caractérisé par l'équation : $R = D \times P$ où D est le danger qui correspond à la toxicité d'un composé et P la probabilité d'occurrence qui est liée aux transferts et au devenir des composés dans l'environnement qui vont mener à une exposition des organismes. À travers différentes directives européennes (67/548/EC, 93/67/EC, 793/93/EC, 98/8/EC et 1488/94/EC), une méthode d'évaluation du risque est apparue dans le but de réglementer l'usage des produits chimiques avec la mise en place de REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). L'écotoxicologie répond donc aux problématiques de gestions environnementales et de réglementation des usages. Une définition de l'écotoxicologie pourrait être : « Science dont l'objet est d'une part l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine (aspect descriptif) et d'autre part de leurs mécanismes d'action et de leurs effets sur l'ensemble des êtres vivants qui peuplent la biosphère (aspect causal) ».

Comme le montre la figure 5, deux cheminements parallèles et complémentaires sont nécessaires à l'évaluation du risque selon la méthode TGD (Technical Guidance Document) proposée par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA : European Chemicals Agency). D'une part, il est nécessaire de déterminer les concentrations prévisibles dans l'environnement (PEC : Predicted Environmental Concentration) et d'autre part, les concentrations prévisibles sans effets (PNEC : Predicted No Effect Concentration). Puis, la confrontation des valeurs permet de mettre en évidence un risque environnemental lorsque la PEC est supérieure à la PNEC.

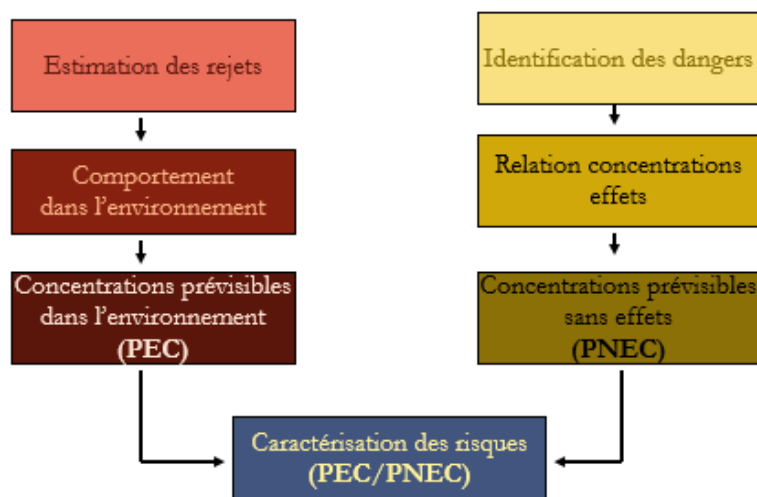


Figure 5 : Méthode d'évaluation du risque environnemental

Cette représentation schématique théorique de l'évaluation du risque environnemental peut sembler bien simple, mais finalement dans l'application, de nombreux verrous existent. La multiplicité des composés dans l'environnement constitue un premier verrou, car il est très difficile de donner une tendance générale commune. Il faut donc la plupart du temps travailler au cas par cas puisque les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des composés leur sont propres. Cette approche présente donc l'avantage de caractériser le risque environnemental de composés pris de façon individuelle. Mais à l'inverse, elle reste très limitée dans la caractérisation des risques liés aux mélanges, qui sont pourtant plus représentatifs des cocktails de contaminants auxquels sont exposés les organismes vivants.

Considérons maintenant la PEC. Sa détermination passe par l'estimation des rejets d'un composé et son comportement dans l'environnement. Comme expliqué plus haut, la diversité des composés n'aide pas à cette détermination, mais vient s'ajouter à cela la diversité des modes et types de rejets (quantitatifs, qualitatifs : urbains/ industriels/agricoles, ponctuels/diffus, en continu/pics, etc.), mais aussi celle des milieux récepteurs qui va jouer un rôle dans le comportement et le devenir des composés dans l'environnement (distribution entre compartiments, élimination, dégradation). Des calculs théoriques peuvent être réalisés pour répondre à l'objectif en s'appuyant sur les données des rejets industriels, les propriétés physico-chimiques des composés (solubilité, valeurs de coefficients de partage, temps de demi-vie, etc.), et les propriétés des milieux récepteurs (quantités de matières organiques, granulométrie, salinité, etc.). Des campagnes de collecte sur le terrain et d'analyse des échantillons issus des milieux sont également un bon moyen de s'approcher le plus possible de la réalité environnementale. Mais il ne faut pas perdre de vue que des limites existent aussi à cette méthode. Tout d'abord, elle représente un coût et un temps conséquent par rapport à des calculs théoriques. Puis, les prélèvements ne sont que des actes ponctuels dans le temps et l'espace, il faut donc être prudent, ne pas extrapoler les résultats et mettre en place des stratégies d'échantillonnage permettant de répondre aux problématiques de départ. Finalement, lorsque les composés sont à l'état de traces, les méthodes analytiques peuvent ne pas être suffisamment performantes pour permettre une quantification voire même une détection. Dans ces derniers cas, des échantillonneurs passifs peuvent présenter un intérêt, à la fois pour concentrer les analytes d'intérêt, mais également fournir un résultat intégratif dans le temps.

Intéressons-nous à présent à l'évaluation de la PNEC qui est elle aussi tout aussi complexe que l'évaluation de la PEC. L'identification des dangers se fait en fonction de la persistance, de la bioaccumulation et de la toxicité des composés. Pour apprécier la persistance, le temps de demi-vie est étudié. La bioaccumulation est exprimée grâce au facteur de bioconcentration ou encore au coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$). Et enfin, la mise en évidence d'une toxicité à des valeurs de concentration/teneur faibles, le caractère Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique (CMR) ou des effets avérés de perturbations endocriniennes sont gage de dangerosité. Lorsqu'un danger est mis en évidence, il est possible d'utiliser des modèles QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) qui sont des modèles mathématiques permettant de prédire la toxicité et la réactivité chimique des molécules en fonction de leur structure. Il est aussi possible d'entamer une étude de la relation « dose-effets » selon différentes approches : de la réalisation de bioessais jusqu'à des études plus représentatives de l'environnement. Les modèles QSAR présentent des avantages et des inconvénients. Si certains modèles sont accessibles sur internet et peuvent être utilisés dans le cadre de la réglementation, le développement d'un modèle *ex nihilo* exige de nombreuses données expérimentales et une validation *a posteriori*. Les bioessais sont des tests effectués en laboratoire destinés à déterminer des activités biocides et/ou des particularités toxicologiques. Ils présentent également de nombreux avantages comme travailler sur différents organismes en s'intéressant à des effets observables à différents niveaux d'intégration biologique ou avec différents composés voire des mélanges, qui est une problématique très difficile à appréhender encore aujourd'hui en écotoxicologie. Ils sont aussi faciles à mettre en œuvre, sensibles et reproductibles. Il existe même des tests standardisés qui présentent l'avantage de pouvoir comparer les résultats entre différentes études. Mais le principal inconvénient de ces bioessais est leur faible représentativité environnementale. En effet, la plupart du temps, ils sont réalisés avec des concentrations très élevées, sur un seul composé et pour de courts temps d'exposition des organismes, ce qui ne reflète pas les conditions naturelles. Pour augmenter le réalisme environnemental, des études de terrain sont menées et correspondent à des expositions faites en laboratoire, du microcosme au mésocosme, en conditions contrôlées, à des concentrations en composés environnementales et sur de longues durées. Si les avantages sont conséquents par rapport aux bioessais, les inconvénients le sont aussi, car ce sont des expériences qui sont lourdes à mettre en place, à maintenir sur la durée et qu'il est impossible de standardiser. Une fois le dispositif d'étude de la relation dose-effet choisi, d'autres verrous apparaissent. Ils se positionnent au niveau du choix de : l'espèce, du stade de vie, de l'état physiologique, de l'âge, de la taille, du genre, etc. pour limiter les variations intraspécifiques et interspécifiques confondantes. Ils se retrouvent également dans le choix des effets à étudier qui sont multiples et le mode d'exposition, puisqu'il existe une relation dose-effet pour chaque composé, voie d'exposition et effet observé.

Un point important en écotoxicologie, est que ce n'est pas parce qu'un composé n'est pas détecté dans un compartiment ou qu'un effet n'est pas observé sur un organisme qu'ils sont absents. En effet, ils peuvent ne pas être décelables dans l'état actuel des connaissances et en utilisant les moyens analytiques du moment. Ainsi des composés utilisés depuis de nombreuses années peuvent être qualifiés de contaminants émergents. Ce n'est pas l'utilisation nouvelle du composé qui caractérise l'émergence, mais la découverte de sa dangerosité, que ce soit au niveau de sa persistance, sa bioaccumulation ou ses effets sur les organismes.

À travers cette présentation succincte de l'écotoxicologie, il est possible de souligner l'omniprésence de la chimie environnementale, que ce soit pour la détermination des concentrations et du devenir des contaminants dans les compartiments des milieux naturels dans le cadre de l'évaluation de la PEC, ou encore dans les dispositifs de type microcosme ou mésocosme mis en œuvre pour étudier la PNEC. Des compétences en biologie, biochimie, physiologie et toxicologie sont complémentaires à celles de la chimie environnementale (Figure 6). Ainsi, j'ai pu m'intégrer à l'équipe ECEm déjà constituée et compléter les compétences déjà existantes qui constituent un atout majeur pour mener à bien des études d'évaluation des risques environnementaux.

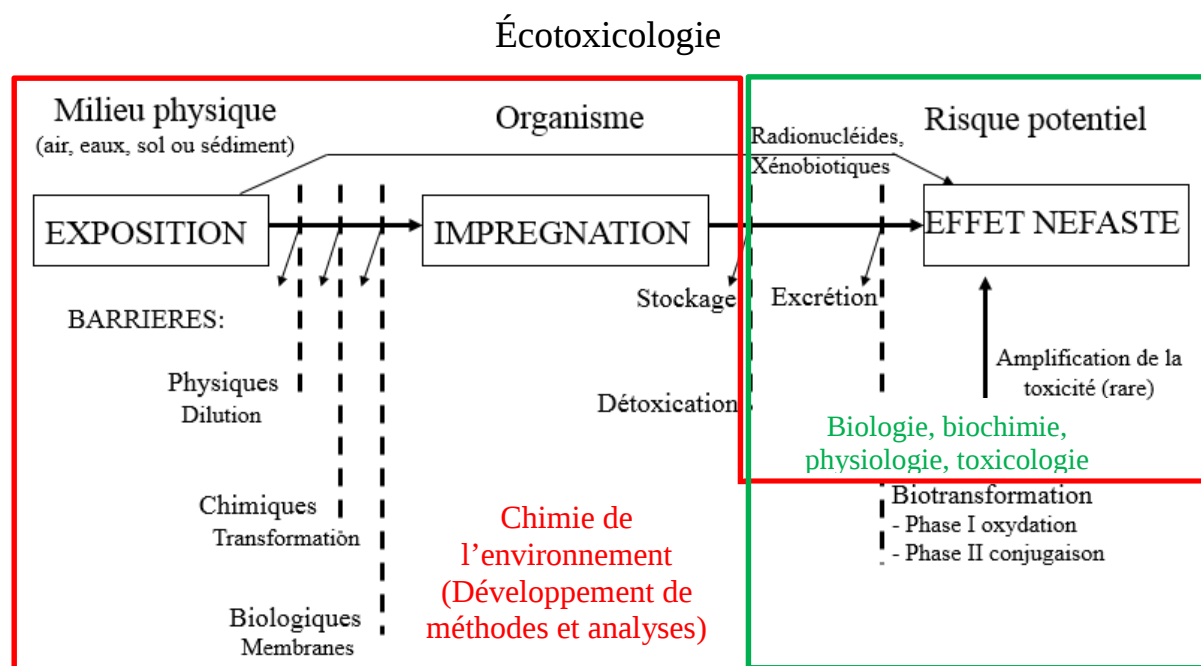


Figure 6 : Positionnement de la chimie environnementale, la biologie, la biochimie, la physiologie et la toxicologie en écotoxicologie

Tout au long de mes activités de recherche, j'ai pu travailler sur plusieurs familles de contaminants, tels que les HAP, les métaux, les nanoparticules métalliques, les perturbateurs endocriniens et les microplastiques. J'ai choisi de présenter les principaux résultats obtenus sur les HAP, les nanoparticules métalliques et les microplastiques dans la suite de ce chapitre.

II. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Une partie de ma recherche effectuée au LCE et au laboratoire MMS a été consacrée à l'étude du niveau de contamination en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) en milieux continental et marin puis l'évaluation de l'imprégnation des organismes vivants exposés. Dans le cadre de mon travail doctoral, et plus généralement du projet européen IRISE, relatif à des sites forestiers incendiés, j'ai réalisé la quantification de 14 des 16 HAP prioritaires dans des sols et des végétaux issus de la forêt du Massif des Maures, après validation des procédures analytiques. Pour ce faire, j'ai utilisé un extracteur automatique de type ASE pour l'extraction et la purification des sols et des végétaux après séchage, broyage et tamisage de chaque échantillon. Afin de préserver de la volatilisation les HAP les plus légers, une attention particulière était portée à l'extrait afin qu'il ne soit jamais évaporé à sec. Puis, l'analyse de l'extrait a été faite par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur de fluorescence programmable (CLHP-DFP). Le but était double : (i) caractériser l'apport en HAP dans les sols après ces événements naturels que sont les feux de forêt, en cherchant à évaluer l'effet de 2 facteurs : la fréquence des feux et leur date d'apparition et (ii) mettre en évidence des traceurs organiques de feux de forêt parmi ces molécules. Puis, l'analyse des végétaux a permis de mettre en évidence la bioaccumulation des HAP après des feux répétés et très récents (année n-1).

Par la suite, lorsque j'ai été recrutée au laboratoire MMS, notre équipe a pu acquérir le matériel manquant à l'analyse des sédiments issus du milieu marin (ASE et CLHP-DFP). Nous avons adapté la méthode à cette nouvelle matrice assez proche du sol, ce qui était en totale adéquation avec les thématiques de recherche de l'équipe. À ces HAP, d'autres molécules d'intérêt en écotoxicologie ont été ajoutées dans l'adaptation de la méthode. Il s'agissait de molécules pouvant émettre des photons par fluorescence après excitation : le bisphénol A, 5 alkylphénols et 2 estradiols. La procédure d'analyse a donc été validée. Puis, la méthode a été transposée et revalidée en UPLC, c'est-à-dire avec l'utilisation de nouvelles colonnes, plus courtes et avec des diamètres de particules plus petits, ce qui a permis de gagner en temps et coût d'analyse. Cette procédure analytique a été utilisée pour l'analyse des sédiments de l'estuaire de la Loire, dans le cadre du stage de Master 2 de Pierre Dubuisson que j'ai encadré, adossé à la thèse de Mickaël Couderc (2014), du projet ExperThyr et du projet RS2E.

Afin de répondre au questionnement scientifique sur l'imprégnation des organismes marins, nous nous sommes intéressés à la mesure des HAP dans le biote du milieu marin. En ce qui concerne les organismes invertébrés qui ne métabolisent pas, ou peu, les HAP, la méthode peut être facilement adaptée à cette nouvelle matrice. En revanche, les organismes vertébrés ont plutôt tendance à métaboliser les HAP. Ainsi, afin de travailler sur l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du projet ExperThyr, mais aussi le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) du projet ContaBEL (dont j'étais la coordinatrice MMS) une nouvelle procédure analytique a dû être développée afin de quantifier les métabolites des HAP dans la bile, qui est une voie d'excrétion des sous-produits de la biotransformation.

Dans cette première partie de chapitre, je vais commencer par présenter brièvement les HAP afin de comprendre l'intérêt de leur étude. Puis, je présenterai les résultats marquants de mes activités de recherche à leur sujet, de l'étude des feux de forêt comme source de contamination à l'évaluation de la contamination d'un milieu aquatique : l'estuaire de la Loire.

II.1. Présentation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les HAP ont considérablement attiré l'attention de la communauté scientifique ces dernières décennies comme le montre la Figure 7. C'est à partir de 1994 que la centaine d'articles publiés par an à leur sujet a été atteinte dans les domaines de l'environnement, la biologie, la chimie, la médecine, la toxicologie de Science Direct. Durant l'année 2018 qui vient de s'écouler, le nombre d'articles publiés par an était supérieur à 1100.

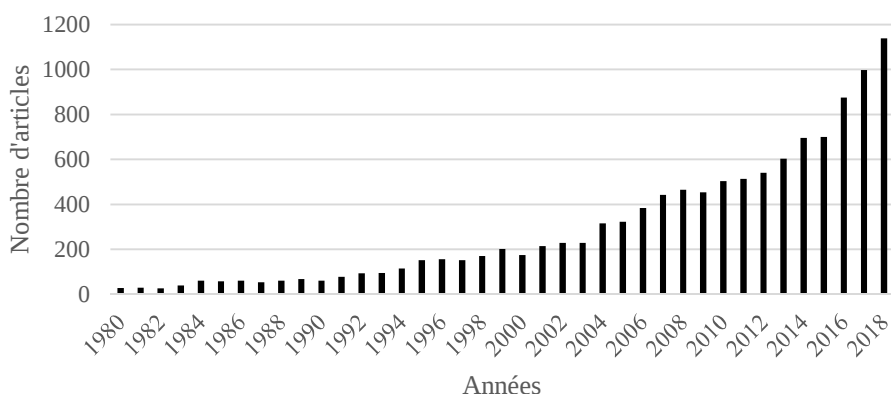


Figure 7 : Nombre d'articles référencés par année dans les domaines de l'environnement, la biologie, la chimie, la médecine, la toxicologie de Science Direct par année avec [PAH ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)

Ces contaminants qui peuvent être caractérisés d'« anciens », ont commencé à être des objets d'études scientifiques dès les années 70 à cause de leurs effets néfastes sur les hommes et les organismes vivants en général (Nisbet and LaGoy, 1992). Il existe plus d'une centaine de composés dans cette famille. Parmi eux, un certain nombre est toxique et cancérigène et ils sont inscrits sur les listes européennes, américaines et internationales des polluants prioritaires à surveiller dans les différents compartiments de l'environnement (the US Environmental Protection Agency (US-EPA), the European Union (EU) and the EU Scientific Committee for Food (SCF)). La Figure 8 récapitule les structures des 16 HAP prioritaires selon l'US-EPA.

En plus d'une toxicité avérée, les HAP sont d'autant plus préoccupants que ce sont des polluants organiques persistants (POP) selon le protocole d'Aarhus, signé en juin 1998 dans le cadre de la convention de Genève. Ils peuvent être transportés sur de longues distances, ce qui les rend véritablement ubiquistes. Néanmoins, il convient de mettre l'accent sur le fait que contrairement aux autres POP très bioaccumulables et récalcitrants à la biodégradation, les HAP peuvent très bien être biotransformés dans les tissus des organismes vivants, vertébrés notamment ou être biodégradés par certains microorganismes.

Les HAP au sens strict ne comportent que des atomes de carbone et d'hydrogène formant plusieurs cycles aromatiques (de 2 à 6), associés de façon condensée, c'est-à-dire qu'il existe une liaison commune entre chaque cycle. Plus un HAP comporte de cycles, plus il est lourd, hydrophobe et lipophile, et moins il est volatil.

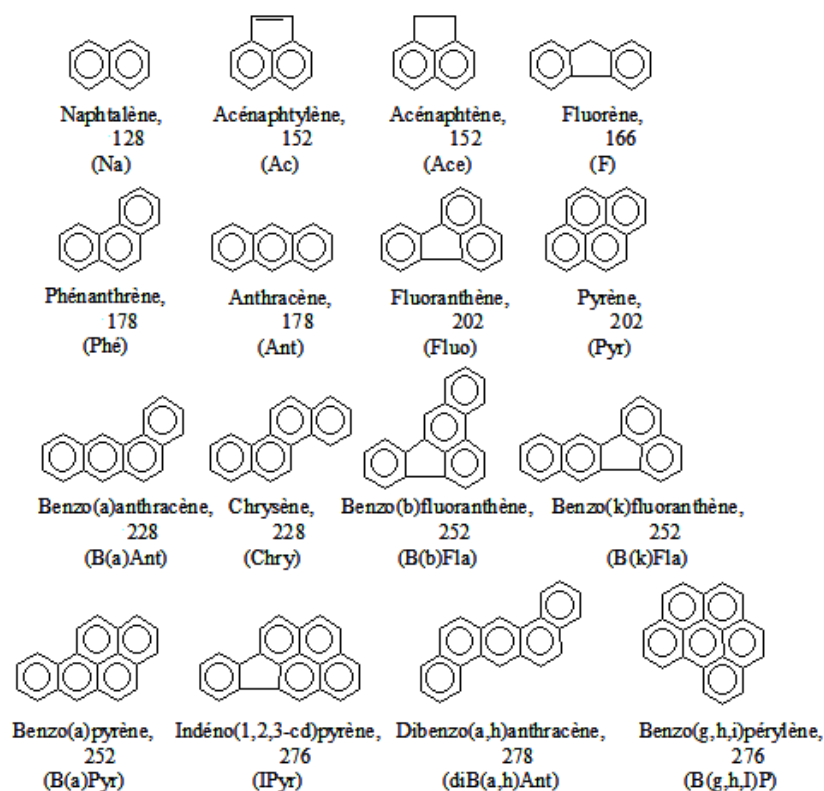


Figure 8 : Noms, formules développées, masses moléculaires et abréviations utilisées pour la liste des 16 HAP prioritaires selon l'US-EPA

La contamination environnementale par les HAP peut être caractérisée de diffuse. En effet, les HAP peuvent être émis lors de phénomènes naturels, comme les éruptions volcaniques ou les feux de forêt (Harvey, 1991 ; Menzie et al., 1992). Mais, les activités anthropiques sont la source majeure en HAP. Il existe deux sources qui sont différenciées. La première est pyrolytique lorsque les HAP sont issus de la combustion incomplète de matière organique à haute température (industrie chimique, sidérurgie, incinération d'ordures ménagères, etc). La seconde source est pétrogénique, ce qui signifie que les HAP sont issus des pétroles et autres combustibles fossiles. Ainsi des ratios indicateurs de l'origine des HAP ont été mis au point : $\text{Phe/Ant} < 10$, $\text{Fluo/Pyr} > 1$ et $\text{Chy/B(a)Ant} < 1$ permettent de conclure à une origine pyrolytique, les valeurs inverses à une origine pétrogénique (Budzinski et al., 1997).

Les HAP possèdent des coefficients de partage octanol/eau relativement grands (log de K_{ow} compris entre 3,3 et 6,6) et une faible solubilité dans l'eau (de 32 mg/l à insoluble) et sont considérés comme semi-volatils. Cette importante hydrophobicité fait qu'ils vont particulièrement s'adsorber sur les particules solides du sol, des sédiments ou encore de l'atmosphère. Ils peuvent alors se déplacer à travers les compartiments environnementaux par dépôt atmosphérique et lessivage, le compartiment environnemental récepteur final devenant principalement les sédiments. Leur dégradation par l'action des micro-organismes étant plutôt difficile, ils sont persistants (Protocol on Persistent Organic Pollutants ; 1999).

Les HAP étant présents et assez persistants dans l'environnement, les organismes vivants y sont exposés. Au-delà de leur capacité d'adsorption sur les matrices solides, leur caractère lipophile fait qu'ils ont tendance à se bioaccumuler dans les tissus adipeux des organismes. Du fait de leur dangerosité, des teneurs maximales admissibles en HAP doivent être établies dans la législation pour éviter tout risque pour l'homme et l'environnement. C'est pour cela qu'en 2005 la communauté européenne a établi des valeurs maximales à ne pas atteindre dans certains aliments en ce qui concerne 15 HAP (Commission Régulation (EC) No 208/2005 du 4 février 2005). Pour les sols, la valeur seuil pour qu'il passe de la catégorie « déchet inerte » à « déchet dangereux » est 50 mg/kg de sol sec, ce qui représente une teneur relativement importante. Enfin, il n'existe aucune valeur seuil pour les sédiments en droit français ou européen.

II.2. Les feux de forêt : source naturelle des HAP

II.2.1 La contamination en HAP des sols de la forêt incendiés du Massif des Maures

La stratégie d'échantillonnage de cette étude relative au projet européen Forest Focus, reposait sur le prélèvement de différents sols de forêt incendiés à des dates et des fréquences plus ou moins récentes et fréquentes respectivement afin d'évaluer l'effet de ces facteurs sur les teneurs en HAP des sols. Deux profondeurs avaient également été collectées. La teneur moyenne totale des 14 HAP des horizons de surface (0 à -5 cm) des sols témoins (non brûlés depuis plus de 50 ans) est de $40 \pm 14 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de matière sèche et n'est pas significativement différente de celle des horizons plus profonds (-5 à -15 cm). Les résultats obtenus pour les horizons de surface des sols brûlés très récemment (année n-1) atteignent en moyenne $150 \pm 56 \mu\text{g.g}^{-1}$ et sont significativement plus importants que ceux des témoins. Cela met en évidence que les feux de forêt génèrent des HAP qui sont ensuite retrouvés après dépôt sur le sol. Enfin, contrairement au facteur "date des feux", aucun effet du facteur "fréquence des feux" n'est détectable sur la teneur totale en HAP. Les teneurs en HAP diminuent ensuite avec le temps passé depuis le dernier feu, probablement par des phénomènes d'érosion, de lessivage, et de dégradation. Plus de 16 ans après le dernier feu, les teneurs moyennes totales dans les sols ne sont plus significativement différentes de celles des témoins. En considérant les horizons de sols plus profonds, les résultats montrent que les feux n'ont pas d'impact significatif.

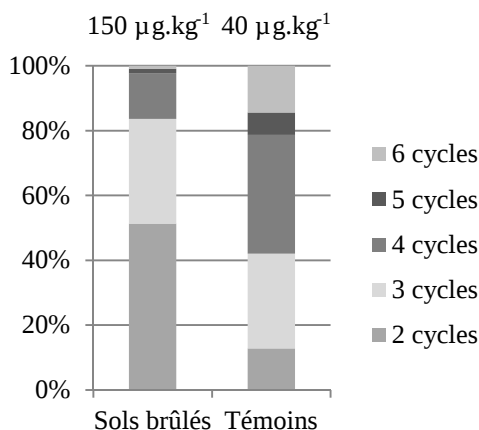


Figure 9 : Profils de distribution des HAP en fonction de leur nombre de cycles aromatiques, des horizons de surface (0 à -5 cm) des sols affectés par un feu très récent (année n-1) et des témoins

Comme le montre la Figure 9 et l'explique la publication A6, la distribution est déséquilibrée en faveur des HAP ayant les masses moléculaires les plus faibles (2 et 3 cycles aromatiques) dans les sols brûlés l'année n-1. En regardant précisément les teneurs de chacun des HAP, ceux à 2 et 3 cycles ont des teneurs significativement plus importantes dans les sols brûlés l'année n-1 que dans les témoins. Mais le pyrène, qui possède 4 cycles, suit aussi cette règle. Le naphthalène est près de 20 fois plus concentré dans les horizons de surface des sols brûlés que dans les témoins. Pour l'acénaphène, le fluorène, le phénanthrène et l'anthracène, les teneurs sont multipliées par des facteurs compris entre 6 et 12 et des facteurs de l'ordre de 2 pour le fluoranthène et le pyrène.

Même s'il semble évident que l'origine des HAP est pyrolytique dans cette étude, les ratios indicateurs sont calculés et ils ne confortent pas tous cette hypothèse avec les valeurs globales : Phe/Ant entre 3,1 et 7,1 (pyrolytique) ; Fluo/Pyr entre 0,9 et 1,2 (plutôt pyrolytique) ; Chry/B(a)Ant entre 2,3 et 2,4 (pétrogénique).

Les résultats obtenus ont permis d'établir un indice (I_{TE}) reflétant le temps écoulé depuis le dernier feu en fonction des teneurs en HAP dans les sols. L'équation permettant le calcul de cet indice est développée ci-dessous :

$$I_{TE} = \frac{\sum (\text{Na, Ace, F, Phe, Ant, Fluo, Pyr})}{\sum (\text{B(b)fla, B(k)fla, B(a)pyr, B(g, h, i)p})}$$

Avec $\sum$ (Na Ace F Phe Ant Fluo Pyr) et $\sum$ (B(b)fla B(k)fla B(a)pyr B(ghi)p) qui sont les sommes des teneurs des différents HAP contenus dans leurs parenthèses respectives.

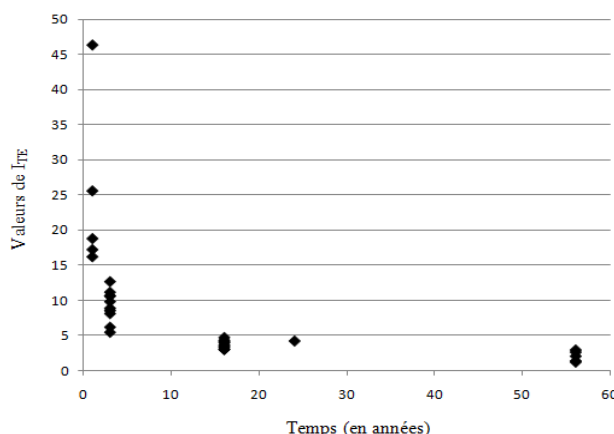


Figure 10 : Évolution temporelle de l'indice I_{TE} pour les horizons de surface (0 -5 cm)

La Figure 10 illustre que, plus le feu est récent, plus la valeur de l'indice est grande. Pour des feux datant d'1 an, l'indice est supérieur à 15. Il est compris entre 15 et 5 pour des feux datant de 3 ans, entre 5 et 2,9 pour des feux de 16 ans. Enfin, il est inférieur à 2,9 pour des feux datant de plus de 50 ans. Cet indice est bien corrélé au temps écoulé depuis le dernier feu, et il pourrait également être considéré comme un indicateur de la remédiation du sol.

Ces travaux ont fait l'objet de

1 article : A6

4 communications orales : CO1, CO2, CO4, CO7

4 posters : P1, P2, P4, P7

II.2.2. L'imprégnation en HAP des végétaux après des feux de forêt

La caractérisation de l'imprégnation en HAP par des végétaux après un feu de forêt récent a été réalisée en comparant les niveaux mesurés sur 5 espèces présentes sur deux sites : un témoin (non brûlé depuis plus de 50 ans) et un brûlé de l'année n-1. Le choix des espèces végétales a été délicat, car elles devaient être présentes sur les 2 sites qui diffèrent beaucoup d'un point de vue composition floristique. Par ailleurs, elles devaient aussi être représentatives du biotope. Finalement, le choix s'est porté sur le chêne-liège (*Quercus suber* : Qs, repoussant à partir du tronc sur le site brûlé), la salsepareille (*Smilax aspera* : Sa), la clématite (*Clematis flammula* : Cf), un liseron (*Convolvulus sepium* : Cs) et l'asperge sauvage (*Asparagus acutifolius* : Aa).

Comme le montre la Figure 11, les teneurs totales en 14 HAP trouvées pour les végétaux issus du site témoin ne sont pas négligeables, et sont comprises entre 81 et 295 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de matière sèche pour les espèces Sa et Cs respectivement. Ces teneurs de fond sont probablement dues à d'anciens feux qui se sont produits de nombreuses années auparavant sur ce site ainsi qu'aux apports atmosphériques des feux alentour et d'origine anthropique, les HAP étant des composés persistants et capables de se déplacer sur de longues distances. La contamination des végétaux peut alors se faire par dépôt et absorption par les parties aériennes ou les racines. Les résultats obtenus pour Cs apparaissent particulièrement importants comparés aux autres espèces prélevées sur le site témoin. Cela peut s'expliquer par le fait, que les individus ont été trouvés et prélevés dans une clairière, ce qui peut entraîner des apports atmosphériques plus importants qu'à l'intérieur du bois.

En considérant les résultats obtenus pour les végétaux issus du site brûlé, la Figure 11 montre que les teneurs sont comprises entre 189 et 794 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de matière sèche pour les espèces Qs et Aa respectivement. En comparant ces valeurs avec celles du site témoin, les feux de forêt semblent entraîner l'augmentation significative des teneurs en HAP pour Qs, Sa et Aa. L'accumulation des HAP par ces espèces n'a pas pu se faire par apport atmosphérique ou une absorption par les parties aériennes des plantes, car elles ont poussé après le feu, et aucun autre feu à proximité n'a été recensé avant le prélèvement. Pour Cs, les teneurs en HAP trouvées sont importantes pour la zone témoin. Cela peut s'expliquer par le fait que cette espèce n'a été collectée qu'en lisière de forêt et peut avoir été contaminée par exposition aérienne accentuée. En ce qui concerne Cf, les teneurs sont faibles pour la zone brûlée et il est possible d'évoquer l'existence d'une capacité de biotransformation des HAP par importante chez ces espèces végétales par rapport aux autres.

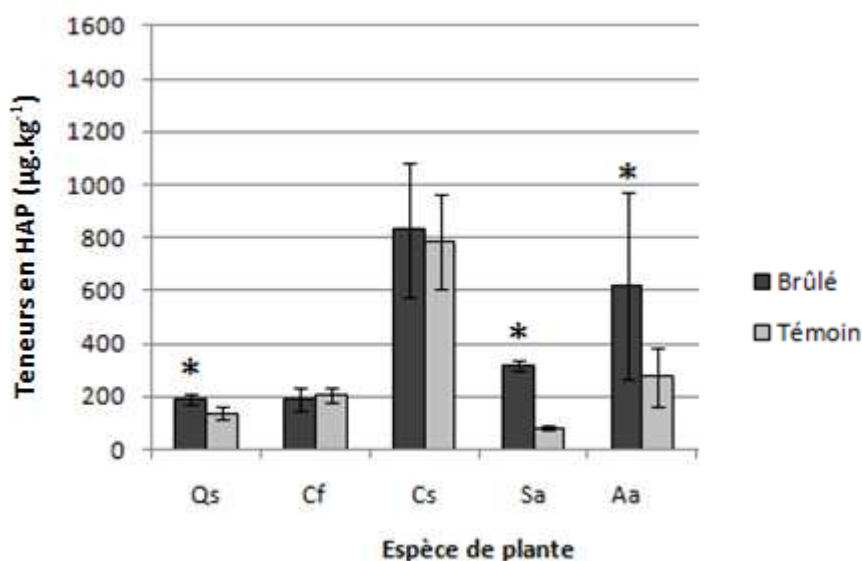


Figure 11 : Teneurs en 14 HAP dans 5 espèces végétales issues d'un site brûlé l'année n-1 et d'un site témoin (non brûlé depuis plus de 50 ans)

Valeur moyenne en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de masse sèche avec l'intervalle de confiance ($n=3$; $\alpha=0,05$)

Qs: *Quercus suber*; Cf: *Clematis flammula*; Cs: *Convolvulus sepium*; Sa: *Smilax aspera*;

Aa(p): *Asparagus acutifolius* (piquante); Aa(t): *Asparagus acutifolius* (tendre)

*: valeurs significativement différentes entre les sols brûlés et témoins

Compte tenu de la teneur totale en HAP du sol brûlé sur lequel ont été prélevées les différentes espèces végétales, le facteur de bioaccumulation est de 2 pour Qs et Cf, 3 pour Sa, 5 pour Aa et 7 pour Cs.

Les profils de distribution des HAP des différentes plantes issues du site témoin sont plutôt différents. Cependant, les HAP à 2 et 3 cycles aromatiques sont dominants avec des teneurs variant de 69 à 89% de la teneur totale en HAP. Par ailleurs, la distribution des HAP dans les végétaux du site brûlé montre que ce sont les HAP avec la plus faible masse moléculaire qui contribuent à l'augmentation de la teneur totale, ce qui est, *in fine*, en accord avec les résultats trouvés pour les sols. Du reste, bien que leur solubilité dans l'eau reste très limitée, plus les HAP sont légers, plus ils sont solubles, mobiles et donc probablement biodisponibles.

II.3. La contamination en HAP du milieu estuarien ligérien

Afin d'étudier la contamination en HAP du milieu estuarien ligérien, plusieurs types de prélèvements ont été réalisés dans le cadre de différents projets de recherche. En ce qui concerne les sédiments, des échantillons ont été prélevés en surface (0 à -5 cm) en estuaire de Loire. Ainsi, 7 sites de la zone subtidale ont été prélevés en septembre 2012 (projet RS2E, les nombres sur la Figure 12) et 6 de la zone intertidale d'avril 2011 et février 2012 (projet ExperThyr, les cercles rouges sur la Figure 12), afin de mettre en évidence un effet saisonnier (4 prélèvements dans l'année). Puis, des individus d'anguilles européennes ont été prélevés en 2011 et 2012 (projet ExperThyr, carrés verts sur la Figure 12) et de bars communs dans 2 zones en 2014 et 2015 (projet ContaBEL : zone B en jaune et zone A en orange sur la Figure 12).

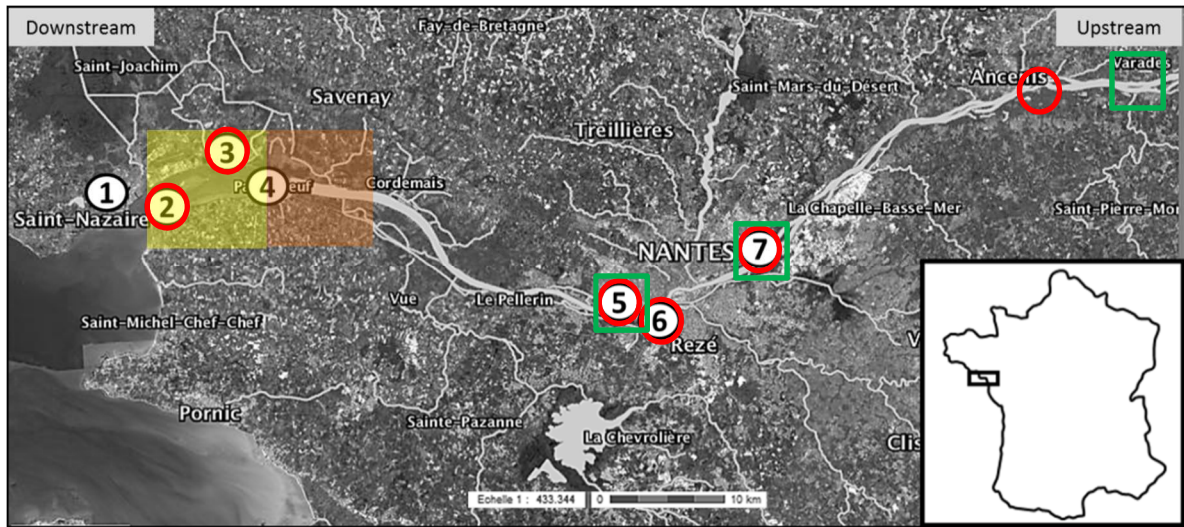


Figure 12 : Carte des points de prélèvements de sédiments et de poissons, de l'aval vers l'amont :
 De 1 à 7 : sédiments subtidaux : Saint-Nazaire, Mindin, Donges, Paimboeuf, Haute-Indre, Rezé, Bellevue
 Cercles rouges : sédiments intertidaux : Mindin, Donges, Haute-Indre, Rezé, Bellevue sud, Ancenis
 Carrés verts : anguilles européennes : Haute-Indre, Bellevue, Varades
 Zones orange et jaune : respectivement zones B et A de l'étude sur le bar commun

II.3.1. La contamination en HAP des sédiments de l'estuaire de la Loire

Les résultats obtenus sur les sédiments de l'estuaire de la Loire ont été publiés dans l'article A17. Les 14 HAP étudiés sont détectés dans tous les échantillons de sédiments prélevés dans l'estuaire de la Loire. En ce qui concerne la zone subtidale échantillonnée en 2012, au niveau de 7 stations réparties le long de l'estuaire de Nantes à Saint-Nazaire, la teneur totale moyenne de tous les sites de l'estuaire s'élève à $694 \pm 580 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de matière sèche. Les teneurs moyennes totales par site varient de 317 ng.g^{-1} de matière sèche près de Mindin à $2004 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de matière sèche près de Haute-Indre (Figure 13). Quant à la zone intertidale, la teneur en HAP totale moyenne de tous les sites et toutes les saisons atteint $1008 \pm 356 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Les valeurs extrêmes concernent le site le plus en aval pour les minimums (Mindin) et celui le plus en amont pour les maximales (Ancenis). Néanmoins, les teneurs sont globalement constantes sur l'ensemble des points de l'estuaire, excepté celui près d'Ancenis où les teneurs sont significativement plus importantes (Figure 13). Par ailleurs, aucun effet saisonnier sur les teneurs en HAP totales et individuelles n'a été mis en évidence.

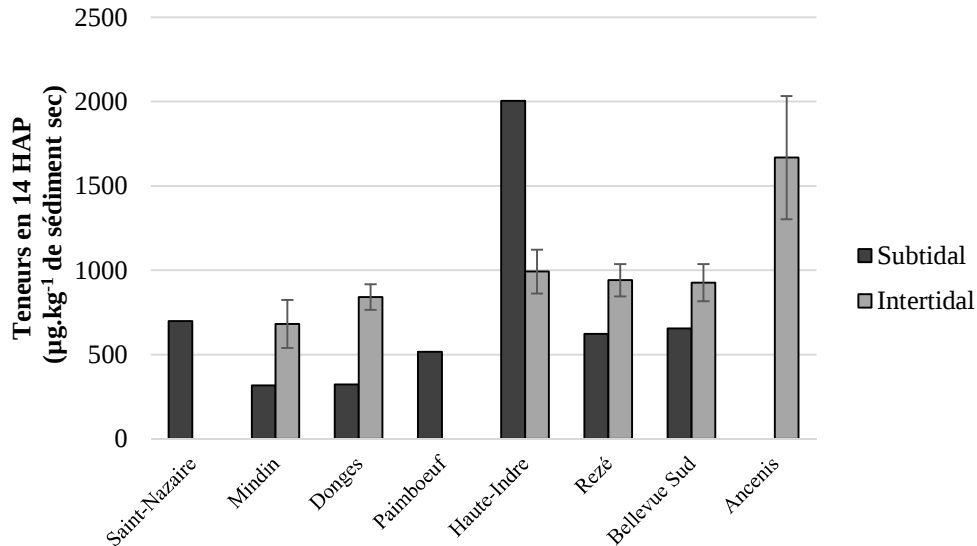


Figure 13 : Teneurs en 14 HAP prioritaires dans les sédiments des zones intertidales (n = 4) et subtidales (n = 1) de l'estuaire de la Loire (en µg/kg de sédiment sec)
L'écart-type est représenté par les barres d'erreur

Les teneurs en HAP plus importantes dans la zone subtidale du site de Haute-Indre pourraient s'expliquer par sa proximité en aval de l'agglomération nantaise et traduiraient une contamination d'origine plutôt urbaine. Cet effet de l'agglomération n'est pas visible dans la zone intertidale probablement à cause du lessivage de la surface des sédiments lorsqu'ils sont mis à découvert lors des marées. Cela expliquerait aussi que les teneurs en HAP soient relativement constantes sur tout le long de l'estuaire en zone intertidale. À Ancenis, la zone de balancement des marées est très limitée, ce qui irait dans le sens de l'augmentation des teneurs en HAP qui est observée.

Les résultats des profils en HAP sont illustrés dans la Figure 14 et montrent que les HAP de plus grande masse moléculaire, c'est-à-dire de 4 à 6 cycles aromatiques, sont prédominants (73 à 84%) dans les sédiments, qu'ils soient issus des zones subtidales ou intertidales. Des tendances similaires ont également été observées dans les sédiments de l'Huveaune et de l'estuaire de Mersey (Kanzari et al., 2014 ; Vane et al., 2007). Globalement les distributions en HAP dans les zones subtidales et intertidales sont très proches, même si la variabilité intra-zone reste plus petite que la variabilité inter-zones.

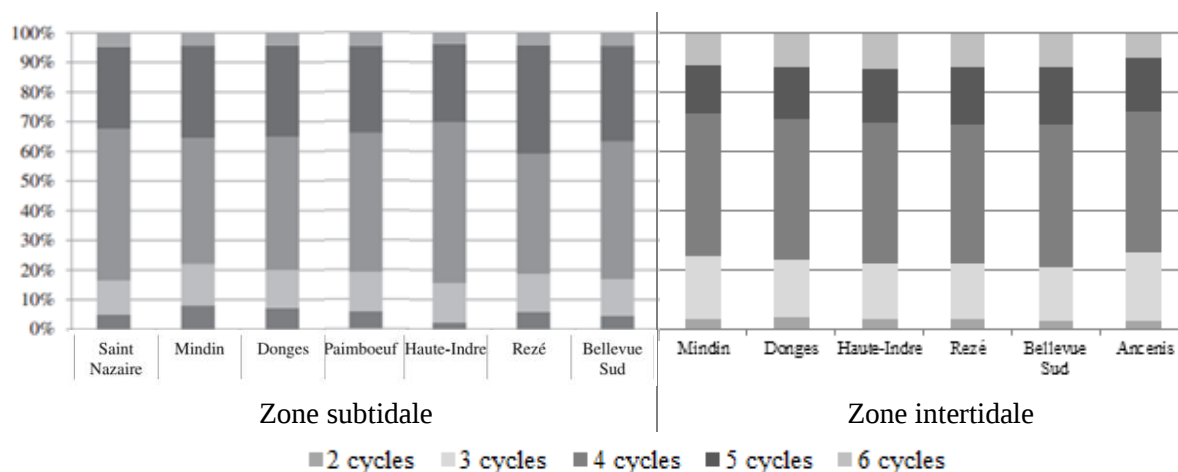


Figure 14 : Distributions des HAP en fonction de leur nombre de cycles aromatiques dans les sédiments des zones intertidale et subtidale de l'estuaire de la Loire (en %)

Le calcul des ratios indicateurs des sources pyrolytiques ou pétrogéniques pour les sédiments prélevés en zone subtidale donne les valeurs globales suivantes : Phe/Ant entre 1,2 et 1,8 ; Fluo/Pyr entre 1,0 et 1,3 ; Chry/B(a)Ant entre 0,2 et 0,3. Ces valeurs confirment toutes une source pyrolytique aux HAP. Pour les sédiments de la zone intertidale, les valeurs obtenues sont : Phe/Ant entre 2,9 et 13,5 ; Fluo/Pyr entre 0,8 et 1,1 ; Chry/B(a)Ant entre 0,4 et 1,3. Dans la quasi-totalité des cas, le ratio Fluo/Pyr conclurait à une origine pétrogénique des HAP alors que les deux autres ratios indiqueraient une origine pyrolytique. Dans la partie portant sur l'étude de HAP dans les sols brûlés, le ratio Chry/B(a)Ant indiquait une origine pétrogénique aux HAP alors que ça n'était probablement pas le cas. Ces ratios semblent donc être particulièrement bien adaptés aux sédiments subtidaux et le seraient plus ou moins en fonction d'autres types de prélèvements. Cela étant, une source pétrogénique est la conclusion de tous les ratios pour quelques prélèvements de sédiments en zone intertidale : au printemps 2011 à Haute-Indre et Bellevue Sud et en été et automne 2011 à Ancenis. Pour ces prélèvements-là, il semblerait qu'il y ait eu une contamination ponctuelle due par exemple à un rejet de pétrole. Le point de prélèvement à Ancenis se situe dans un port de plaisance, celui à Haute-Indre près du ponton du bac qui assure la liaison rive nord-rive sud de la Loire et celui à Bellevue Sud est en contrebas du périphérique de Nantes. Ces localisations particulières pourraient expliquer une contamination ponctuelle de ce type.

Ces travaux ont fait l'objet de :

1 article : A17

1 communication orale : CO20

II.3.2. L'imprégnation en HAP de deux espèces piscicoles

- Le bar commun (*Dicentrarchus labrax*)

Les teneurs en HAP présentées ci-dessus ont été déterminées dans des échantillons de bars, muscles ou restes (c'est-à-dire l'individu entier sans muscle), prélevés en 2014 et 2015. Afin que la quantité de matière soit suffisante pour l'analyse, les échantillons ont dû être constitués à partir de mélanges de différents individus pour constituer des pools. Les données sont présentées en fonction de la zone de prélèvement (Figure 15 ; zones A et B), du genre (mâle, femelle, indéterminé) et du stade de développement du poisson : immature (autour de 11 cm) ou juvénile (près de 20 cm). Le but est de mettre en évidence des effets de la zone de prélèvement, du stade de maturité et du sexe des poissons, sur leur imprégnation en HAP. Le nombre de réplicats est limité allant de $n = 1$ à $n = 3$ seulement à cause d'une part de la faible quantité de matière du fait de la petite taille des individus récoltés et d'autre part du partage des échantillons fait entre les laboratoires d'IFREMER et le nôtre.

Les sommes des 14 HAP retrouvés dans les échantillons sont présentées sur la Figure 15.

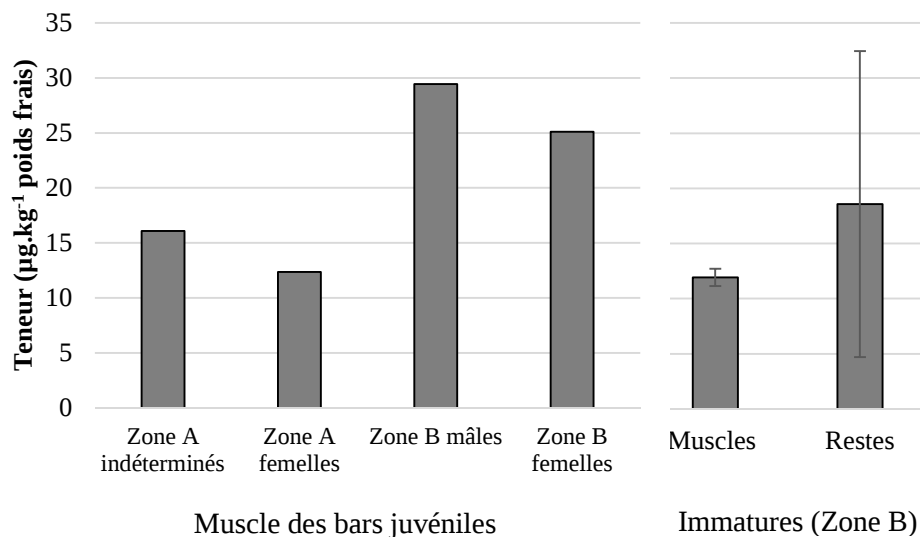


Figure 15 : Teneurs en HAP dans les muscles et les restes de bar en µg.kg⁻¹ de poids frais (juvéniles : zone A : $n = 1$; zone B mâles et femelles : $n = 2$; Immatures zone B muscles et restes $n = 3$; les barres d'erreur correspondent aux écarts types)

Étant donné le faible nombre de pools analysés, il est impossible de mettre en évidence des différences significatives de contamination des muscles de bars juvéniles entre les sites de prélèvement (zone A et B) et le sexe. Néanmoins, ces résultats montrent le niveau de contamination de cette espèce en estuaire de Loire. Les teneurs en HAP sont comprises entre 13 et 29 µg.kg⁻¹ de poids frais. Aucune différence significative n'est observable entre les teneurs retrouvées dans les muscles et les restes des individus immatures prélevés en zone B. Les HAP ne sont pas préférentiellement accumulés dans le muscle plutôt que le reste des individus ou vice versa.

En ce qui concerne la distribution des HAP dans les organismes, aucun HAP de plus de 4 cycles aromatiques n'a pu être détecté. Les profils de contamination présentés dans la Figure 16 le démontrent.

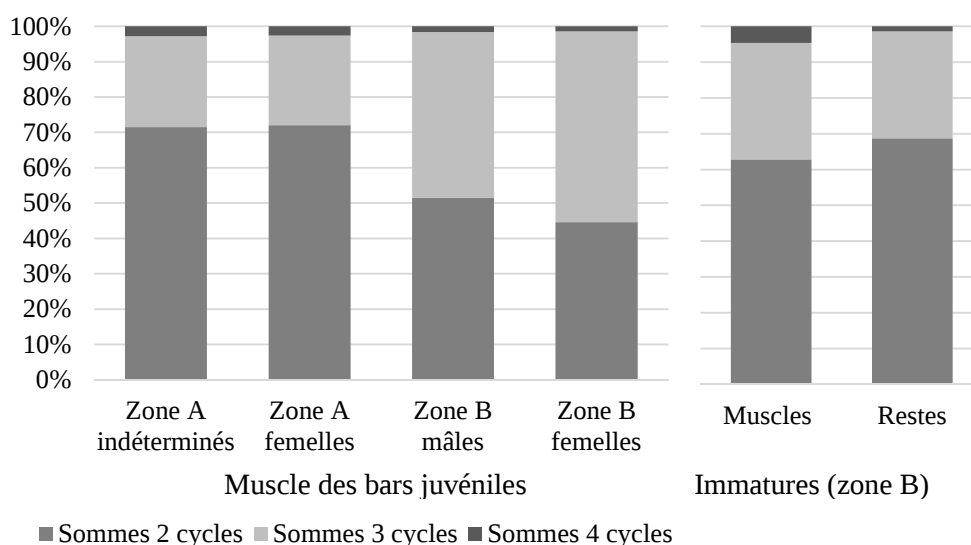


Figure 16 : Profils des HAP dans les muscles et restes de bar en fonction du nombre de cycles. (juvéniles zone A : n = 1 ; juvéniles zone B mâles et femelles : n = 2 ; Immatures zone B muscles et restes n = 3)

Uniquement 3 groupes de HAP sont représentés (2 cycles : Na, Ace, F ; 3 cycles : Phe, Ant et Fluo ; 4 cycles : Pyr, B(a)pyr et Chry). Les HAP à 2 cycles aromatiques sont majoritaires dans quasiment tous les échantillons (environ 45 à 73 %). À propos des muscles des juvéniles de la zone A, les distributions sont identiques pour les individus indéterminés et les femelles. Par ailleurs, plus les HAP possèdent de cycles aromatiques, moins leur proportion est grande. Cela est également le cas pour les muscles des juvéniles de la zone B. L'effet site est prédominant sur l'effet sexe. Il est cependant nécessaire de valider ces observations d'un point de vue statistique en multipliant les analyses d'échantillons pour chacune des zones. Les profils des pools de bars immatures de la zone B sont proches de ceux obtenus pour les juvéniles de la zone A et B. Enfin, il n'y a pas de différence significative entre les profils obtenus pour les muscles et les restes des immatures de la zone B.

Le poisson étant connu pour ses capacités de métabolisation des HAP, le muscle ne constitue pas forcément le tissu privilégié pour étudier l'exposition aux HAP. En fonction des espèces de poissons, les HAP peuvent être présents sous forme de traces dans leurs tissus (Tuvikene et al., 1999). Ainsi, la métabolisation rapide des HAP chez la sole (Trisciani et al., 2011), chez le mulot (Della Torre et al., 2010) expliquerait les faibles teneurs en HAP retrouvées dans le muscle de ces espèces. Ainsi, l'effort d'analyse a aussi porté sur la bile des plus gros bars capturés, afin que la quantité d'échantillons soit suffisante, c'est-à-dire 3 femelles de bars adultes (14-21 cm). Les métabolites recherchés étaient : 1-OH-Phe, 9-OH-Phe, 1-OH-Pyr, 2-OH-Na, et 2-OH-Fluo. Les 9-OH-Phe, 2-OH-Fluo ne sont pas détectés dans les échantillons. Le Tableau 10 monte des teneurs relativement faibles des autres métabolites, qui sont non uniformes d'un point de vue qualitatif et quantitatif pour ces 3 individus notés de 1 à 3.

Tableau 10 : concentrations en métabolites de HAP dans la bile de 3 femelles de bars adultes

	Concentrations (en ng/mL)		
	1-OH-Phe	1-OH-Pyr	2-OH-Na
1	-	-	1,27
2	5,87	14,51	-
2	-	20,87	-

- : non détecté

Trisciani et al. (2011) ont également mesuré des métabolites de HAP dans la bile de la sole de Méditerranée (*Solea solea*), en parallèle des HAP dans le muscle. Ils trouvent peu de HAP dans les muscles (3 à 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids sec) et de grandes variations des métabolites biliaires au niveau individuel, avec principalement des métabolites de Pyr et Na, comme notre étude sur le bar. La variation des données dans les études de terrain s'explique probablement par un facteur important qui est le statut alimentaire, comme proposé par Collier and Varanasi (1991) chez la sole anglaise (*Parophrys vetulus*). Dans notre étude sur le bar, le contenu qualitatif et quantitatif en métabolites de HAP des biles étant variable pour des individus adultes, il est assez difficile de les comparer à ceux obtenus pour les HAP dans les muscles et restes d'individus immatures et juvéniles, d'autant plus que ces derniers sont également très disparates. L'étude d'un nombre d'échantillons plus conséquent, ainsi que la quantification des composés dans la bile et le muscle des mêmes individus pourrait être envisagée afin d'approfondir ce point d'étude.

- L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*)

L'étude sur les anguilles, publiée en 2015 (A16), concerne des individus argentés dits « dévalant » (c'est-à-dire qu'ils se dirigent vers l'aval du fleuve), arrivés à maturation sexuelle, prélevés en 2011 (n = 6), et des individus jaunes, inféodés à un site, prélevés en 2012 à Varades (n = 6), à Bellevue (n = 8) et à Haute-Indre (n = 6). Les métabolites recherchés sont les mêmes que ceux de l'étude sur le bar présentée précédemment. Les concentrations moyennes totales en métabolites de HAP varient entre 29,9 et 148,8 ng.mL^{-1} de bile avec des concentrations de 1-OHPyr et de 1-OHPhe prédominants, atteignant respectivement 25,5 à 100,5 ng.mL^{-1} et 3,6 à 38,0 ng.mL^{-1} . Comparée à d'autres localisations européennes, la contamination des anguilles de l'estuaire de la Loire est plutôt faible (Gorbi et al., 2005 ; Nagel et al., 2012 ; Ruddock et al., 2003). Aucune différence significative de concentration totale en métabolites n'apparaît entre les différents stages de maturité de l'anguille (jaune et argentée) et les différents sites de prélèvement des anguilles jaune (Varades, Bellevue et Haute-Indre).

Les profils de contamination en métabolites dans la bile sont donnés dans la Figure 17.

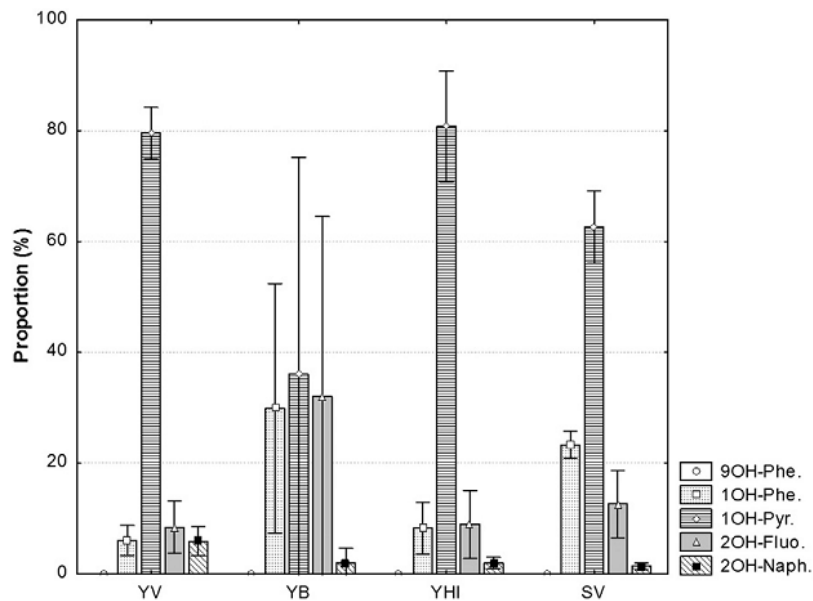


Figure 17 : Profils des métabolites de HAP quantifiés dans la bile d'anguilles européennes de l'estuaire de la Loire au stade de maturité jaune issues de 3 sites (YV: Varades (n = 6); YB: Bellevue (n = 8); YHI: Haute-Indre (n = 6) et argenté (SV; n = 6). Les barres d'erreur correspondent aux écarts types

Parmi les 5 métabolites de HAP analysés, le 1-OHPyr est le majoritaire dans la bile d'anguille quel que soit le stade de maturité et le site de prélèvement. Bien qu'il soit considéré comme le métabolite le plus abondant dans la bile du poisson et le meilleur indicateur de l'exposition aux HAP (Ariese et al., 1993, Beyer et al., 2010, Ruddock et al., 2003; Van Der Oost et al., 2003), il n'est pas détecté dans tous les échantillons de bile de cette étude. L'étude de l'influence spatiale et du stade de maturité sexuelle sur la distribution des métabolites montre des différences significatives. Globalement, les profils de distribution des anguilles argentées et des jaunes de Varades et Haute-Indre sont assez similaires alors que ceux des anguilles jaunes de Bellevue semblent être différents et présentent une grande variabilité en fonction du site de prélèvement.

Ces travaux ont fait l'objet de

1 article : A16

1 communication orale : CO14

II.4. Bilan sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les teneurs en HAP des sols témoins et brûlés du Massif des Maures sont bien moins importantes que celles des sédiments de l'estuaire de Loire, avec un facteur d'environ 10 à 100. En termes qualitatifs, la nature des HAP retrouvées dans ces deux zones d'étude est bien différente également avec des distributions privilégiant les HAP avec peu de cycles aromatiques dans les sols brûlés. Cette différence provient du fait que le Massif des Maures est relativement préservé des activités anthropiques et que les apports en HAP sont principalement d'origine naturelle. À l'inverse, l'estuaire de la Loire est sous forte pression anthropique avec une grande densité urbaine, des activités agricoles et industrielles sur ses berges. De plus, de par les caractéristiques physico-chimiques des HAP, ces derniers vont préférentiellement se stocker dans les sédiments qui vont être le réservoir ultime d'accumulation de la contamination pour ce type de contaminants organiques hydrophobes et assez persistants.

Les organismes vivant au contact des HAP présents dans le milieu naturel vont s'en imprégner. Le transfert a été mis en évidence par la mesure de teneurs en HAP dans des espèces végétales collectées en forêt du Massif des Maures et des espèces animales, plus précisément piscicoles, échantillonnées en estuaire de Loire. Il existe des différences interspécifiques de contamination. En effet, les espèces végétales ne présentent pas les mêmes teneurs en HAP, ni les mêmes distributions, et cette observation est également valable en comparant les résultats obtenus pour les deux espèces piscicoles. Le mode de vie des organismes et leur fonctionnement biologique interviennent dans l'exposition et le processus d'imprégnation. Par exemple, dans un même écosystème, le bar qui est pélagique, c'est-à-dire vivant dans la colonne d'eau, n'est pas exposé de la même façon que l'anguille qui est benthique, c'est-à-dire qui vit au contact du sédiment. Elles n'ont pas le même régime alimentaire non plus et l'anguille étant particulièrement riche en lipides favorise le stockage des contaminants organiques hydrophobes. Par ailleurs, des processus de détoxification plus ou moins efficaces peuvent être mis en place par certaines espèces pour lutter contre la contamination, ce qui justifie de s'intéresser aux métabolites. Finalement, des différences intraspécifiques sont également possibles et des facteurs comme le stade de développement, l'âge, le genre, etc. jouent sur l'imprégnation et la capacité de métabolisation des organismes.

Ces travaux de recherche contribuent à l'évaluation de la contamination en HAP de divers milieux et espèces vivantes. Même si des différences de teneurs et de profils sont notables, il est indéniable que les HAP sont ubiquistes, principalement de par leur rejet diffus dans l'environnement. Ces travaux montrent aussi que le lien entre la contamination abiotique et biotique est souvent bien difficile à réaliser. Le processus d'imprégnation des espèces fait intervenir de nombreux facteurs qui sont à l'origine de ce constat, de même que la métabolisation. À plus grande échelle, étant donné que les espèces piscicoles étudiées sont consommées par l'homme, ces travaux permettent très partiellement d'évaluer l'exposome.

Enfin, la transformation de ces contaminants par action biologique, photolytique, etc. peut mener à la formation de sous-produits de dégradation, les oxy-HAP, potentiellement plus toxiques que les composés parents. L'analyse des 16 HAP n'est donc pas suffisante et doit s'étendre aux produits de dégradation pour une meilleure prise en compte de la toxicité.

Après avoir présenté mes travaux de recherche sur la famille de composés organiques que sont les HAP dans cette première partie, je vais traiter de contaminants minéraux que sont les métaux, sous forme nanoparticulaire.

III. Les nanoparticules métalliques

Dans le cadre de mes activités de recherche, j'ai travaillé sur la contamination par les contaminants organiques, comme illustré avec les HAP dans le chapitre précédent. J'ai également consacré une grande partie de mon temps à l'analyse de métaux dans le cadre de ma thèse en tout premier lieu. En effet, j'ai pu étudier l'enrichissement des sols de forêt en certains métaux après des incendies, plus ou moins répétés, afin d'essayer de mettre en évidence des traceurs élémentaires des feux de forêt. Ce volet de mon travail doctoral m'a permis de m'approprier les méthodes de préparation d'échantillons et d'analyses *ad hoc* au sein du Laboratoire d'Analyse RadioChimique (LARC) de la Direction de l'Énergie Nucléaire (DEN) au Centre d'Énergie Atomique (CEA) de Cadarache. J'ai commencé par minéraliser les échantillons de sols séchés, broyés et tamisés à l'aide d'un four à micro-ondes. Puis les minéralisats ont ensuite été analysés à l'aide de torches à plasma couplées soit à la spectrométrie de masse soit à la spectrométrie d'émission atomique (ICP-MS, ICP-AES).

À mon arrivée dans l'équipe ECEm du laboratoire MMS, un vaste champ d'étude portant sur les nanoparticules métalliques commençait à être investigué. Deux programmes, l'un européen (NanoReTox) et l'autre international (GdR iCEINT), étaient en cours et l'implication de l'équipe se faisait sur l'évaluation de l'écotoxicité des nanoparticules en utilisant des espèces endobenthiques modèles, un annélide (*Hediste* ou *Nereis diversicolor*) et un bivalve (*Scrobicularia plana*). Cette thématique a ensuite perduré au travers du projet européen NanoReg et de l'ANR NanoSalt. Dans le cadre de ces projets de recherche, des expositions à divers types de nanoparticules ont été menées en laboratoire avec les espèces modèles choisies. La partie du travail dans laquelle je me suis investie était l'évaluation du devenir des nanoparticules dans le milieu d'exposition et de la bioaccumulation métallique par les organismes modèles. Ainsi, j'ai pu encadrer 4 étudiants de Master 1 et 2 (Cyrielle Castagné, Pierre Dubuisson, Eva Delatour et Fayza Zouaoui) et 1 doctorante (Carole Bertrand, 2016) sur ces problématiques. Les analyses de métaux étaient tout d'abord réalisées par minéralisation à l'acide en bloc chauffant et spectrométrie d'absorption atomique par électrothermie. Puis, grâce à l'acquisition d'un four à micro-ondes conjointe avec une autre équipe de l'UFR qui s'est également équipée d'une torche à plasma couplée à un spectromètre de masse, j'ai pu mettre à profit mes compétences techniques en analyse élémentaire, acquises durant mon travail doctoral.

Afin de répondre aux questionnements scientifiques du devenir des nanoparticules, et de l'imprégnation métallique des organismes, des nanoparticules d'argent, d'oxyde de cuivre et de sulfure de cadmium ont été employées. Les nanoparticules étant utilisées dans des nano-produits de la vie quotidienne, des expositions à un pansement contenant des nanoparticules d'argent ont également servi à des expositions en laboratoire pour étudier leur cycle de vie. Les dispositifs d'exposition étaient variés, allant de l'utilisation de simples aquariums, avec ou sans nourrissage des organismes, jusqu'à des mésocosmes avec des conditions contrôlées en laboratoire, mais également un peu moins contrôlées en extérieur. Les effets de la salinité et du nourrissage des organismes ont été étudiés.

Dans ce deuxième chapitre, je vais commencer par présenter brièvement les nanoparticules afin de comprendre les enjeux et l'intérêt de les étudier. Puis, je présenterai les résultats marquants de mes activités de recherche sur ce sujet.

III.1. Présentation des nanoparticules métalliques

Comme le montre la Figure 18, il s'est produit un véritable engouement de la communauté scientifique pour les nanoparticules métalliques depuis 2009, année à partir de laquelle le nombre d'articles scientifiques à leur sujet a dépassé la centaine par an dans les domaines de l'environnement, la biologie, la chimie, la médecine et la toxicologie dans Science Direct. L'année 2018 vient de se terminer et le nombre d'articles publiés sur le sujet a dépassé le millier.

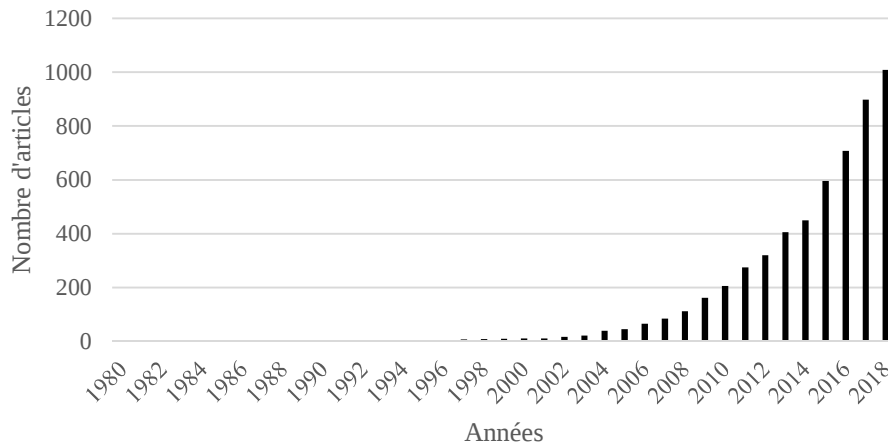


Figure 18 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [nanoparticle ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)

Les nanoparticules font partie des contaminants que l'on qualifie d'émergents puisqu'elles ont été utilisées de façon exponentielle ces dernières années dans de nombreux produits du quotidien, notamment sans que leurs effets toxiques sur l'homme et l'environnement ne soient véritablement connus.

Les nanoparticules font partie de ce que l'on appelle les nanoobjets, comme les nanoplaques ou encore les nanofibres. L'origine de ces nanoobjets peut être naturelle ou anthropique. En ce qui concerne les nanoobjets naturels, il est possible de citer les aérosols marins ou encore les colloïdes. L'homme produit également des nanoobjets pour les incorporer notamment dans la composition de nanomatériaux manufacturés, puis de nanoproducts. De nombreux objets de la vie quotidienne sont des nanoproducts issus des secteurs de l'informatique, l'agroalimentaire, les cosmétiques, l'énergie, la santé, etc. Les propriétés de la matière sont modifiées en fonction de la taille qui lui est donnée. Les changements liés à la modification de la taille sont principalement la surface spécifique, qui engendre un nombre démultiplié d'atomes en surface de la matière. D'autres paramètres influencent également les propriétés de la matière sous sa forme nanométrique comme sa composition (interne et externe), sa morphologie, sa dimension dans l'espace, son uniformité, etc. Selon Nel et al. (2006), 7 types de nanomatériaux existent et les nanomatériaux métalliques constituent l'un de ces types.

D'un point de vue de la réglementation européenne, REACH a été mis en place afin de réglementer d'imposer aux industriels le dépôt d'un dossier sur les dangers et les risques des nouvelles substances qu'ils veulent mettre sur le marché. Cela étant, les nanomatériaux ne sont la plupart du temps pas concernés pour plusieurs raisons. Ceci n'est pas stipulé comme étant obligatoire lors de leur enregistrement. En effet, ils ne sont pas considérés comme de nouvelles substances, notamment pour les métalliques, ce qui par conséquent permet aux industriels de s'affranchir des modalités telles que l'apport de données (éco)toxicologiques.

III.2. Mise en place expérimentale

III.2.1. Expositions en aquariums vs mésocosmes

Les dispositifs les plus simples utilisés pour l'évaluation du devenir des nanoparticules métalliques et l'imprégnation des organismes modèles endobenthiques étaient des béciers ou des aquariums installés au laboratoire, en conditions de luminosité et température contrôlées. Ces aquariums étaient remplis d'eau de mer, sans sédiment. Puis, afin d'augmenter le réalisme environnemental, une plateforme de mésocosmes en laboratoire a été mise en place. Les conditions de luminosité et température étaient toujours contrôlées, du sédiment a pu être ajouté dans le fond, mais la plus grosse évolution du système réside dans la création d'un cycle de marée artificiel. Finalement, des expériences ont aussi été menées au plus près des conditions environnementales grâce à l'installation de mésocosmes de plus grande capacité, en extérieur, sur le site de l'Houmeau près de La Rochelle, avec la collaboration du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs). Avec les systèmes présentés sur la Figure 19, non seulement la marée était recréée, mais les conditions climatiques, d'éclairement et de température étaient directement celle du milieu naturel, même si celles-ci n'étaient plus véritablement contrôlées.

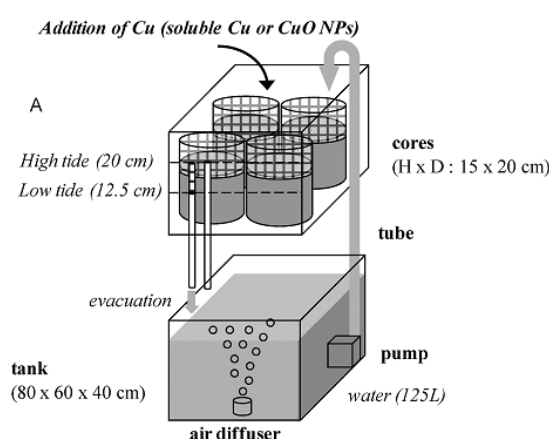


Figure 19 : Schéma du dispositif expérimental avec un système de cycle de marée artificiel déployé en extérieur sur le site de l'Houmeau, près de La Rochelle

Outre le réalisme des conditions environnementales souhaité, le but des expérimentations était de travailler sur des durées d'exposition des organismes relativement longues (jusqu'à 21 jours) par rapport à ce qui peut être fait par ailleurs dans le domaine de l'écotoxicologie. Cela étant, d'un point de vue de l'espérance de vie des espèces, ces temps d'exposition peuvent être considérés comme encore trop limités.

III.2.2. Designs expérimentaux

Afin d'évaluer le devenir de nanoparticules métalliques et leur imprégnation par les organismes modèles endobenthiques, plusieurs conditions d'exposition en laboratoire étaient indispensables. En effet, des blancs négatifs et des blancs positifs étaient réalisés en parallèle des expositions aux nanoparticules métalliques réalisées, tous réalisés en triplicats. Trois enceintes non contaminées constituaient les blancs négatifs alors que les blancs positifs correspondaient à trois autres enceintes contaminées à l'aide soit d'ions Ag^+ en solution, soit d'ions Cu^{2+} en solution ou encore de chlorure de cadmium (CdCl_2).

III.2.3. Nanoparticules, nanomatériau et nanoproduct étudiés

Les nanoparticules étudiées durant les différentes expérimentations publiées dans les articles A7, A10, A12, A13, A15 et A21, sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques des nanoparticules métalliques étudiées

Nom	Constitution	Enrobage	Taille	Distribution de taille en eau de mer (30 PSU)
Ag NP	Ag	Maltose	40-45 nm	40-500 nm
CdS NP	CdS	-	5-10 nm	5-10 nm
CuO NP	CuO	-	1-100 nm	nd ^a
NM-300K	Ag	-	15 nm	15-70 nm
Acticoat TM	Ag	-	-	-

NP : nanoparticule ; NM : nanomatériau ; NAP : nanoproduct ; ^a : non déterminé

Les nanoparticules d'argent (Ag NP) et celles de sulfure de cadmium (CdS NP) ont été préparées par le Joint Research Center (JRC, Ispra, Italie) et livrées sous forme de suspension, alors que celles d'oxyde de cuivre (CuO NP) ont été achetées auprès d'Intrinsic Materials Limited sous forme de poudre.

Le nanomatériau d'argent NM-300K est officiellement représentatif des nanomatériaux manufacturés en suspension (10%, m/m) dans une solution dispersante de polyéthylène glycérol trioléate (4%, m/m) et de Tween 20 (4%, m/m) selon le Joint Research Center.

Quant à l'ActicoatTM, il s'agit d'un nanoproduct, c'est-à-dire d'un pansement antimicrobien nanocristallin enrobé d'argent. Des noyaux de polyester recouverts d'argent sont pris en sandwich entre deux couches de polyéthylène haute densité contenant également de l'argent. Les mesures d'argent dans le pansement par unité de surface ont été réalisées et un carré de 0,4 cm de côté a été utilisé pour la contamination des enceintes d'exposition, permettant d'obtenir une concentration finale d'exposition d'environ 50 µg/L.

Toutes les autres concentrations d'exposition choisies étaient de 10 µg/L et sont réalistes d'un point de vue environnemental en considérant les concentrations totales en métaux des milieux naturels. Cette concentration a été utilisée à la fois pour contaminer les enceintes avec les nanoparticules, mais aussi avec les ions en solution correspondants pour les contrôles positifs.

Le choix de la nature du métal est également intéressant d'un point de vue écotoxicologique puisque Cu est un élément essentiel contrairement à Ag et au Cd.

III.2.4. Évaluation du devenir des nanoparticules métalliques

La quantification directe des nanoparticules dans un milieu environnemental représente encore un verrou analytique. En effet, il n'existe pas de méthode ou d'outil analytique permettant de les quantifier directement dans des matrices environnementales, puisqu'il faudrait évaluer à la fois la nature et la taille des nanoparticules. L'échantillonneur passif de type « Diffusive Gradients in Thin films » (DGT), a été utilisé pour pouvoir évaluer de façon indirecte la dissolution des nanoparticules métalliques dans les milieux contrôlés et donc la part des nanoparticules restée sous forme particulaire. Ces échantillonneurs passifs ont été ajoutés aux aquariums ou mésocosmes en présence des organismes. Ils sont constitués d'un socle sur lequel sont déposés une résine Chelex 100, un gel diffusif et une membrane (figure 20A). Pour les expérimentations, 2 types ont été utilisés comme illustré dans la Figure 20B. Certains sont dédiés à l'analyse de la colonne d'eau et d'autres aux sédiments. L'utilisation des DGT pour les sédiments présentait un avantage qui était l'étude du devenir des métaux labiles en fonction de la profondeur du sédiment, après découpe de la résine en tronçons.

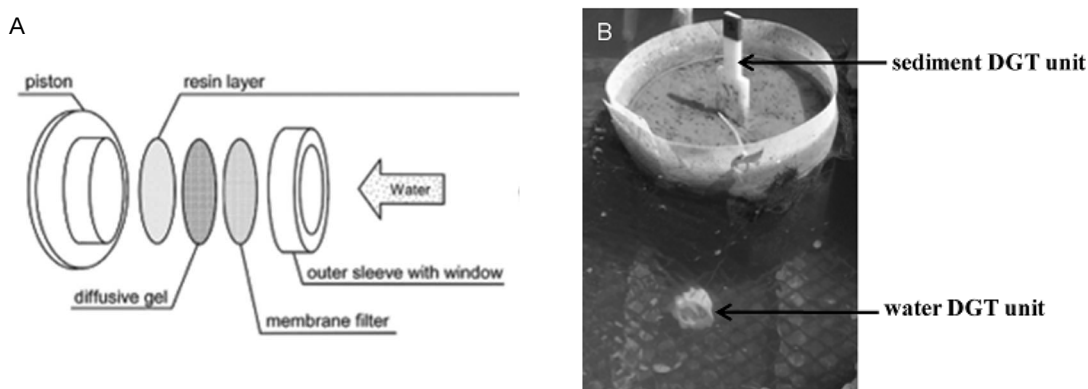


Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental avec un système de cycle de marée artificiel déployé en extérieur sur le site de l'Houmeau, près de La Rochelle

Les métaux labiles diffusent au travers la membrane et le gel diffusif puis s'adsorbent sur la résine. Après démontage des dispositifs et désorption des métaux à l'aide de solutions acides, les métaux sont alors analysés par SEA ou SAA, ou encore par ICP-MS. La collecte des DGT s'est faite pour chaque expérimentation de façon échelonnée à différents temps pour apprécier l'évolution de l'adsorption au cours du temps.

III.2.5. Évaluation de l'imprégnation des organismes modèles endobenthiques

Les espèces modèles utilisées lors des expositions en laboratoires étaient un annélide (*Hediste* ou *Nereis diversicolor*) et un bivalve (*Scrobicularia plana*). Ces espèces ont été choisies pour différentes raisons. En effet, ce sont des espèces endobenthiques, c'est-à-dire qu'elles vivent enfouies dans le sédiment, qui est le réceptacle ultime d'un bon nombre de contaminants. Ce sont également des espèces clés de leur écosystème puisqu'elles constituent la source alimentaire de nombreuses autres espèces et ont une forte activité de bioturbation.

Elle possède une large aire géographique de distribution, elles sont bien représentées, elles possèdent un fonctionnement biologique bien connu et elles sont souvent utilisées en laboratoire, car il est assez facile de les maintenir en conditions artificielles. Les individus sont collectés en Baie de Bourgneuf, puis acclimatés avant les expositions en laboratoire. La densité de population maintenue pour les expérimentations était proche d'une densité observée dans des vasières intertidales. Pour en faire l'analyse, les organismes étaient individuellement minéralisés à l'acide (mélange HCl/HNO₃ (3 :1), excepté pour l'argent pour lequel seulement HNO₃ était utilisé) puis analysés en SAA, SEA, ou encore ICP-MS.

Plusieurs expositions en laboratoire ont été réalisées afin de déterminer l'imprégnation de ces organismes endobenthiques modèles, en parallèle de la détermination du devenir des nanoparticules métalliques en milieux contrôlés. La combinaison des informations du devenir et de l'imprégnation est nécessaire afin de comprendre les mécanismes qui s'opèrent. L'imprégnation des organismes a été d'abord étudiée à travers l'exposition par la contamination de l'eau des milieux (colonne d'eau). Puis une expérience a été menée afin d'évaluer l'importance du transfert de contamination en cadmium aux organismes par voie alimentaire. Finalement, d'autres expositions ont suivi pour mesurer l'effet de la salinité du milieu et du nourrissage sur la contamination métallique des organismes.

III.3. Devenir des nanoparticules métalliques en milieux contrôlés

III.3.1 Colonne d'eau

Les quantités de métaux labiles dans la colonne d'eau et adsorbées sur la résine des DGT aux différents pas de temps étudiés sont reportées sur la Figure 21 en fonction de la nature métallique de la nanoparticule et du dispositif expérimental utilisé (aquarium ou mésocosme en extérieur). Ces résultats sont issus des articles A7, A10, A12 et A13.

Les courbes de l'évolution de l'accumulation des métaux labiles dans le DGT dans le temps sont croissantes pour toutes les conditions de toutes les expérimentations, excepté les contrôles de l'expérimentation avec le cadmium. Le cuivre et l'argent mesurés dans les DGT des contrôles sont probablement issus de l'eau de mer et/ou des sédiments qui ont été prélevés dans le milieu naturel. Ces derniers ne devaient pas contenir de concentrations suffisantes en cadmium pour être détectés.

Les masses de métaux adsorbées par les DGT sont très différentes en fonction de la nature des métaux et des dispositifs d'exposition. Ces différences s'expliquent par plusieurs facteurs :

- la diffusion au travers du gel de diffusion de la DGT,
- l'adsorption à la résine Chelex 100,
- la compétition entre les espèces pour les sites d'adsorption,
- la présence ou non de sédiment,
- la nature de l'eau et du sédiment utilisés pour remplir les dispositifs.

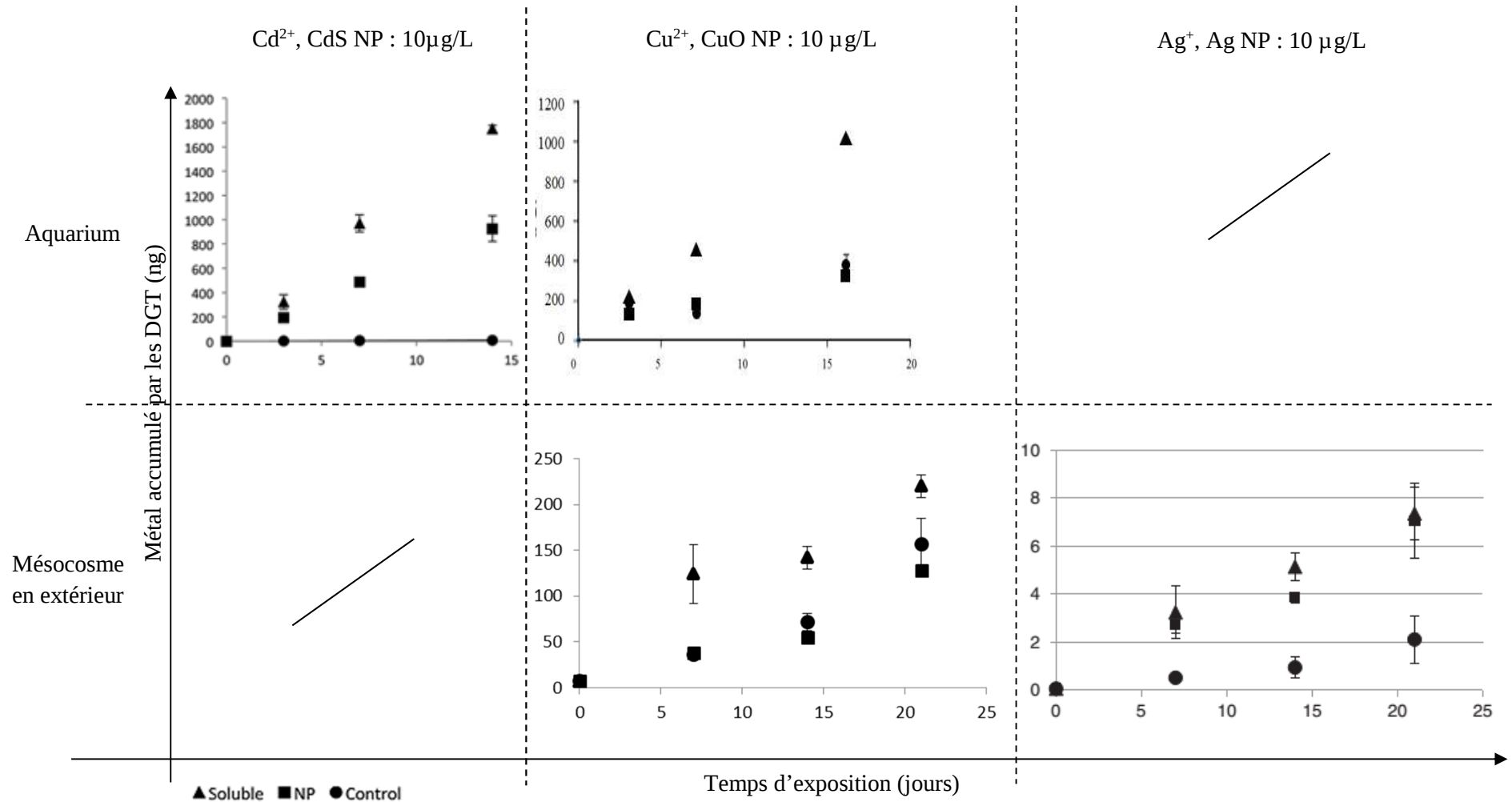


Figure 21 : Moyennes (et écarts-types, n = 3) des masses de métal labile (Cd, Cu, Ag) accumulées par les DGT déployées dans la colonne d'eau des aquariums et mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à différents temps. (0, 3, 7 et 14 ou 16 jours pour les aquariums et 0, 7, 14, 21 jours pour les mésocosmes), exprimées en ng

Les résultats de la Figure 21 montrent que le devenir des nanoparticules dans la colonne d'eau est dépendant de la nature du métal. Les masses de cuivre accumulées par les DGT sont équivalentes dans les conditions de contamination aux nanoparticules et les contrôles alors que celles dans les conditions de contamination au Cu^{2+} sont significativement supérieures. Cela montre que les nanoparticules de CuO sont peu dissoutes dans la colonne d'eau sur le laps de temps de l'étude. Cette observation est valable, quel que soit le dispositif utilisé : aquarium ou mésocosme. À l'inverse, les masses d'argent accumulées dans les DGT des conditions de contamination aux nanoparticules et à l' Ag^+ sont similaires et significativement supérieures à celles des contrôles tout au long de l'expérimentation. Dans ce cas, il est possible de conclure à une dissolution rapide et complète des nanoparticules d'argent. Finalement le devenir des nanoparticules de sulfure de cadmium est intermédiaire. En effet, les masses de cadmium accumulées par les DGT des conditions de contamination aux nanoparticules sont entre celles des contrôles et des conditions de contamination au Cd^{2+} . Un peu plus de la moitié des nanoparticules est dissoute et l'autre partie reste sous forme nanoparticulaire tout au long de l'expérience.

III.3.2 Sédiment

Des carottes de sédiment étaient présentes dans les dispositifs des mésocosmes en extérieur, ce qui a permis d'étudier à la fois le devenir des métaux dans la colonne d'eau et les sédiments avec l'utilisation de DGT spécifiques (voir articles A7 et A10). La Figure 22 illustre les masses totales de métaux adsorbées sur les DGT sédiment pour l'argent et le cuivre. Ces DGT sédiment avaient été découpées à chaque cm afin de pouvoir affiner l'étude du devenir des métaux sur la profondeur de la carotte. La Figure 23 montre les profils issus de l'analyse de chacune de ces découpes au temps final d'exposition de 21 jours.

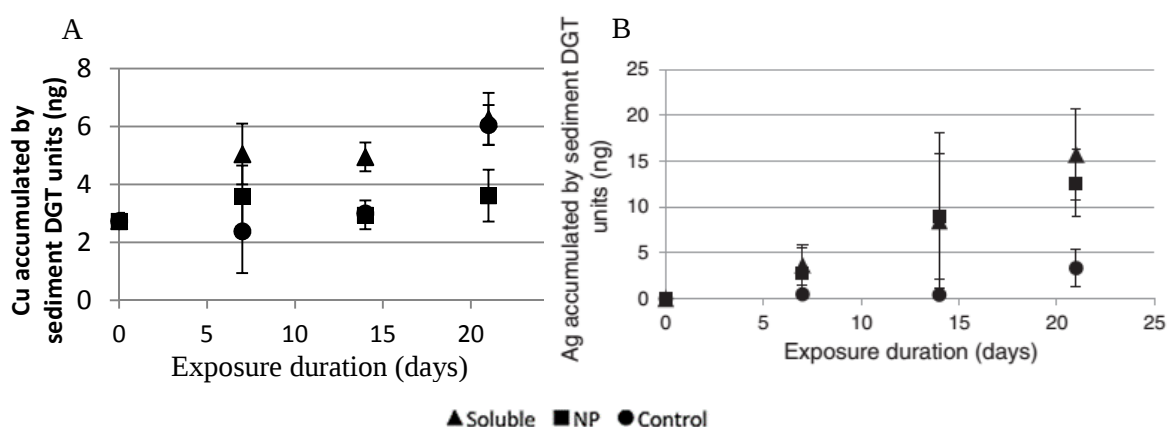


Figure 22 : Moyennes (et écarts-types, n = 3) des masses de métal labile (A : Cu, B : Ag) accumulées par les DGT déployées dans le sédiment des mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à différents temps (0, 7, 14, 21 jours), exprimés en ng

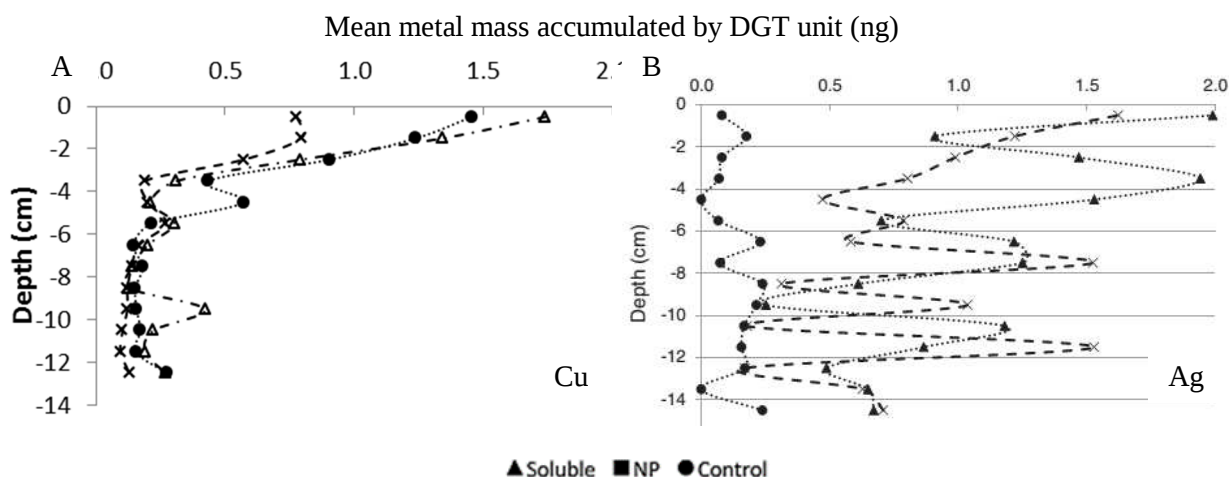


Figure 23 : Moyennes (n = 3) des masses de métal labile (A :Cu, B :Ag) accumulées par les DGT déployées dans le sédiment des mésocosmes exposés aux 3 différentes conditions expérimentales (control : ronds, soluble : triangles et NP : carrés) à 21 jours d'exposition en fonction de la profondeur, exprimées en ng

Les résultats obtenus pour les masses de métal adsorbées sur les DGT sédiment sont en concordance avec ceux obtenus pour la colonne d'eau. Les masses totales de cuivre accumulées sur les DGT sédiment sont équivalentes, voire inférieures, pour les conditions de contamination au cuivre nanoparticulaire comparées aux contrôles. Ce qui traduit une faible dissolution du cuivre sous forme nanoparticulaire. Pour l'argent, les masses totales accumulées sur les DGT sédiment sont similaires pour les conditions de contamination à l'argent soluble et sous forme nanoparticulaire et significativement plus élevées que celles des contrôles. La conclusion à cela est une dissolution totale de l'argent nanoparticulaire.

En s'intéressant aux profils de la Figure 23, il est possible de noter des comportements du cuivre et de l'argent en profondeur du sédiment bien différents après 21 jours d'expérimentation. Alors que le cuivre semble plutôt accumulé dans les 4 cm de surface du sédiment, quel qu'il soit la condition d'exposition, l'argent va plutôt avoir tendance à migrer en profondeur pour les conditions de contamination. En effet, après dissolution, l'argent va se mobiliser dans la profondeur du sédiment, comme le montrent les amplitudes de variations des concentrations en argent en fonction de la profondeur. L'action de bioturbation des organismes endobenthiques (*S. plana* et *H. diversicolor*) est un élément explicatif de la migration de métaux mobiles, comme l'argent, alors que celle-ci n'aura aucune incidence sur des métaux comme le cuivre.

La détermination du devenir des nanoparticules dans un milieu contrôlé, comme dans le milieu naturel, est indispensable pour connaître les formes et les teneurs auxquelles sont exposés les organismes et potentiellement mettre en évidence un effet de la forme de contamination métallique sur l'imprégnation et les effets engendrés.

III.4. Imprégnation des organismes en milieux contrôlés

III.4.1 Exposition par contamination du milieu aquatique

L'imprégnation des organismes endobenthiques en métaux a été évaluée pour chacune des conditions d'exposition menées en laboratoire (articles A7, A10, A12, A13 et A15). Pour ce faire, 10 organismes de chaque espèce ont été analysés individuellement afin de prendre en compte la variation intraspécifique. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 24 pour les métaux et les dispositifs évoqués plus haut. Comme le montre la Figure 24, l'imprégnation est dépendante de la nature du métal, et/ou de sa forme, et/ou de l'espèce.

En ce qui concerne le cadmium, l'imprégnation des organismes est significative lors de contamination. Les teneurs mesurées dans les deux différentes espèces endobenthiques sont non significativement différentes pour chaque condition. Les teneurs en cadmium sont plus importantes chez les organismes exposés au cadmium sous forme nanoparticulaire comparées à la forme soluble. Étant donné que les nanoparticules de cadmium ne se dissolvent pas complètement (Figure 24), il semblerait que la forme du métal joue un rôle sur la bioaccumulation. La forme nanoparticulaire engendrerait une augmentation de la bioaccumulation, et ce, chez les deux espèces.

En prenant en considération les résultats du cuivre, il existe une différence interspécifique marquée lors de l'utilisation des mésocosmes qui n'apparaît pas dans les aquariums. Dans les aquariums, une bioaccumulation est mise en évidence chez les deux espèces et pour les deux formes de cuivre. Alors qu'en mésocosmes, quelle que soit la forme du cuivre, une bioaccumulation est mise en évidence chez *S. plana*, alors que seule la forme nanoparticulaire mène à une bioaccumulation significative chez *H. diversicolor*. Dans ce dernier cas, étant donné que les nanoparticules de cuivre sont peu dissoutes (Figure 24), la forme du métal et l'espèce sont les deux facteurs jouant un rôle sur la bioaccumulation.

Enfin pour l'argent, la tendance à la bioaccumulation est identique quel que soit la forme de l'argent et l'espèce étudiée. Étant donné que les nanoparticules d'argent sont quasiment entièrement dissoutes (Figure 24), les organismes sont exposés uniquement aux ions Ag^+ dans toutes les conditions de contamination, ce qui mène à une bioaccumulation équivalente pour les deux formes. Il est possible de noter tout de même des teneurs près de deux fois plus importantes chez *H. diversicolor* comparé à *S. plana*. Par ailleurs, les teneurs en Cu sont également bien plus importantes que celles en cadmium et argent. Cela peut être attribué au fait que cet élément est indispensable à la vie contrairement aux deux autres.

La différence interspécifique de bioaccumulation observée lors des expositions au cuivre en mésocosmes est peut-être due à la façon de s'alimenter des espèces. En effet, *H. diversicolor* est un ver vivant dans des terriers en forme de U ou de Y, en étroit contact avec le sédiment. Cette espèce omnivore consomme principalement de la matière organique et des détritiques se trouvant à la surface des sédiments et des comportements filtreurs et carnivores ont également été reportés dans la littérature. En ce qui concerne le bivalve *S. plana*, il s'alimente en siphonnant le sédiment de surface et de sub-surface qui entoure son terrier au cours des périodes d'immersion. Lorsque le sédiment est pauvre en matière organique, il est capable d'en ingérer de grandes quantités.

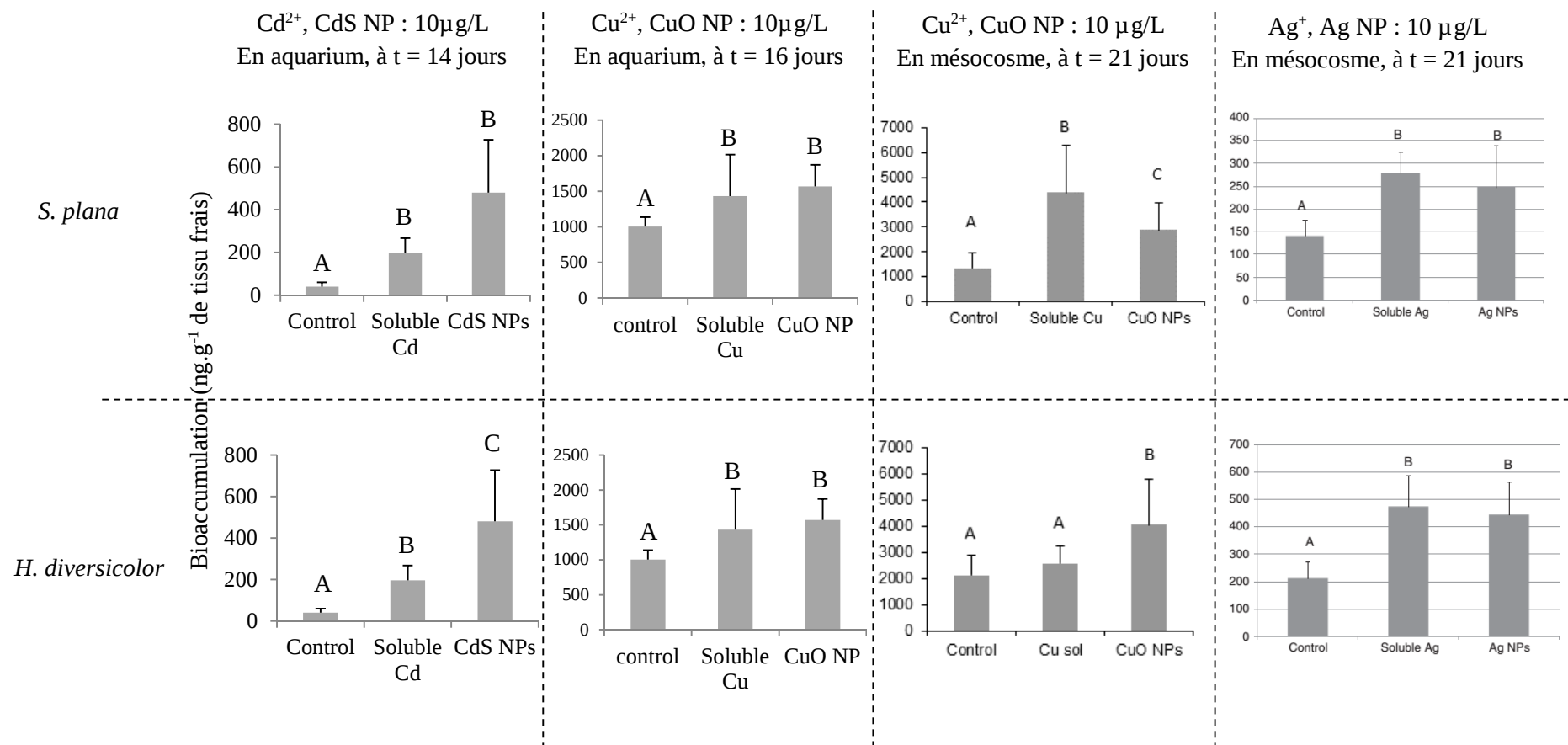


Figure 24 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en métaux (Cd, Cu, Ag) bioaccumulés par deux espèces endobenthiques (*Scobicularia plana* et *Hediste diversicolor*) aux temps finaux d'exposition en laboratoire (14 j et 16 j en aquarium pour Cd et Cu ainsi que 21 j en mésocosme pour Cu et Ag), exprimées en ng.g⁻¹ de tissus frais

Lors des expositions au cuivre en aquarium, la même différence interspécifique de bioaccumulation n'est pas mise en évidence. L'influence du mode d'alimentation des espèces n'apparaît pas dans ce cas. Ce qu'il est important de souligner ici c'est que dans les mésocosmes du sédiment était présent, alors qu'il ne l'était pas dans les aquariums. L'absence de sédiment pourrait modifier le comportement alimentaire et l'exposition des deux espèces au cuivre. De plus, le sédiment entraînant potentiellement une rétention du cuivre en surface, comme observé sur la Figure 24, le rendrait moins biodisponible. Les résultats de la Figure 24 montrent aussi que les masses de cuivre accumulées par les DGT sont plus importantes dans les dispositifs d'exposition en aquarium qu'en mésocosme contenant du sédiment ce qui corrobore l'hypothèse d'une influence de la présence du sédiment.

Par ailleurs, les bioaccumulations du cuivre et du cadmium ne sont pas similaires pour les différentes conditions malgré le fait que le dispositif d'exposition soit identique. Une hypothèse explicative peut être avancée. La biodisponibilité des ions et nanoparticules de cuivre et de cadmium serait différente, car dépendante des caractéristiques intrinsèques des ions métalliques et des nanoparticules (taille, agrégation, etc.) et joueraient sur leur devenir, l'exposition et la prise des organismes dans le milieu d'exposition. Les nanoparticules de cuivre étant de taille plus importante que celle de cadmium, sembleraient moins biodisponibles. D'ailleurs, la Figure 24 montre aussi que les masses de cuivre accumulées par les DGT déployées dans la colonne d'eau sont plus importantes pour le cadmium que pour le cuivre.

- *Influence de la salinité sur l'imprégnation*

Les expériences de laboratoire qui ont ensuite été menées avaient pour but, en partie, de déterminer l'effet de la salinité sur l'imprégnation en argent du bivalve *S. plana* qui est une espèce euryhaline. Les résultats sont publiés dans l'article A21. Les salinités d'étude étaient 15 et 30 Practical Salinity Unit (PSU). Lors de ce travail, le choix du contaminant s'est porté sur un nanomatériau d'argent officiellement représentatif des nanomatériaux manufacturés, dont le nom est NM-300K. La suspension de nanoparticules d'argent (10%, m/m) se trouve dans une solution dispersante constituée de polyéthylène glycérol trioléate (4%, m/m) et de tween 20 (4%, m/m). Pour réaliser l'étude, quatre conditions ont été menées en parallèle sur 7 jours, impliquant des expositions contrôles, à l'argent soluble, à la suspension de nanoparticules et à la solution dispersante. De plus, la glande digestive étant l'organe le plus bioaccumulateur de *S. plana*, les mesures d'argent ont été réalisées sur celle-ci après dissection des organismes. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 25.

Les résultats montrent qu'une accumulation d'argent dans la glande digestive apparaît comme significative dans les conditions de contamination aux deux formes d'argent, quelle que soit la salinité. Néanmoins, la salinité présente un effet sur les niveaux d'accumulation. En effet, les teneurs en argent des glandes digestives sont significativement plus élevées à 15 PSU qu'à 30 PSU. La bioaccumulation semble être donc favorisée à une salinité plus faible. En parallèle de ces données, l'utilisation de DGT déployées dans la colonne d'eau révélait à 7 jours 78% et 38% de dissolution des nanomatériaux d'argent aux salinités 15 et 30 PSU respectivement, non significativement différentes l'une de l'autre. Cela révèle une dissolution de l'argent non influencée par la salinité.

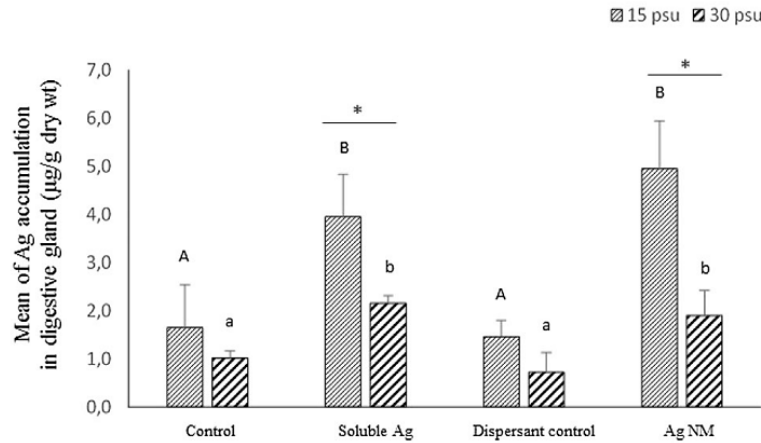


Figure 25 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en argent mesurées dans la glande digestive de *S. plana* après 7 jours d'exposition à quatre conditions (contrôles, argent soluble, solution dispersante et nanomatériau d'argent) à deux salinités (15 et 30 PSU), exprimées en ng.g⁻¹ de tissus secs

L'argent dissous peut être supposé comme étant la source prédominante d'argent dans les glandes digestives, quelle que soit la forme de contamination initiale. L'absorption d'argent en phase dissoute par *S. plana* est considérée comme une source de contamination potentiellement très importante en raison des grandes quantités d'eau filtrées pour son alimentation. L'augmentation de la salinité, et donc de la force ionique, mène à une diminution de la biodisponibilité de l'argent. En effet, lorsqu'il est sous forme ionique, l'argent est susceptible de se complexer et précipiter, notamment avec les ions chlorures pour lesquels il présente une forte affinité et qui sont en grande quantité dans l'eau de mer reconstituée à 30 PSU.

- *Influence du nourrissage sur l'imprégnation*

Pour poursuivre le travail sur l'imprégnation des organismes, il semblait intéressant d'étudier l'effet potentiel du nourrissage. Pour réaliser cette expérience, des expositions en laboratoire ont été menées avec le nanomatériau NM-300K, la solution de dispersion correspondante et un nanoproduct : le pansement ActicoatTM. Tout comme l'étude précédente, deux salinités de travail ont été utilisées : 15 et 30 PSU ainsi que l'espèce modèle euryhaline *S. plana*. Dans certains aquariums, les organismes ont été nourris avec *Tetraselmis suecica* inoculée de manière à obtenir une concentration algale dans les milieux d'exposition de 1.10⁵ cellules/mL. Et dans d'autres aucun nourrissage n'a été effectué. Les expositions ont duré 7 jours et les résultats obtenus sont reportés dans la Figure 26.

Les résultats montrent le même effet de la salinité sur la bioaccumulation de l'argent que précédemment mais seulement lorsque les organismes ne sont pas nourris. Dans cette condition, les teneurs en argent retrouvées dans les glandes digestives des organismes sont plus élevées à 15 PSU qu'à 30 PSU. Avec nourrissage, la tendance semble plutôt inversée avec des teneurs en argent plus importantes à 30 PSU qu'à 15 PSU, même si cela n'est pas significatif. Par ailleurs, à 15 PSU, l'accumulation d'argent n'est pas significativement différente en fonction des conditions d'exposition et du nourrissage, ce qui est en contradiction avec l'expérience précédente. À 30 PSU, des différences de bioaccumulation sont observées avec des teneurs en argent supérieures pour les conditions d'exposition au nanomatériau et au nanoproduct, mais seulement en condition de non-nourrissage.

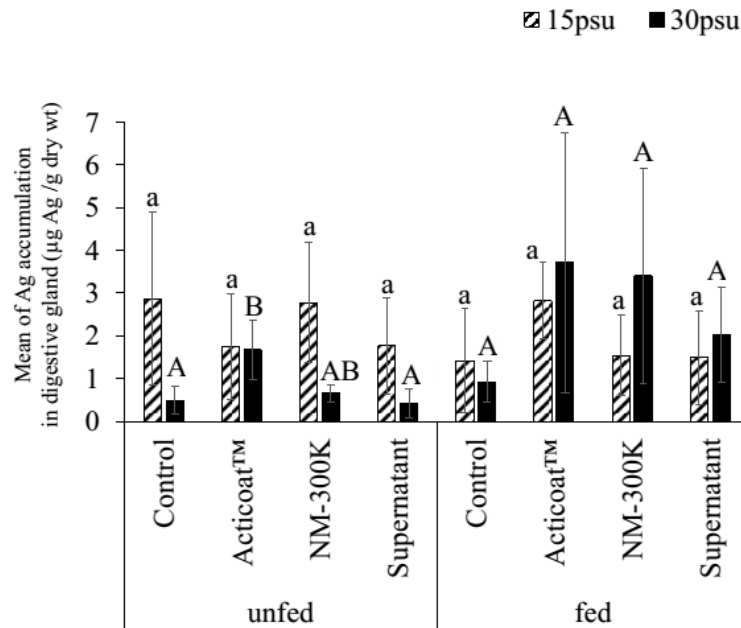


Figure 26 : Moyennes (et écarts-types, n = 10) des teneurs en argent mesurées dans la glande digestive de *S. plana* après 7 jours d'exposition à quatre conditions (contrôles, nanoproduit Acticoat™, nanomatériau d'argent NM-300K et solution dispersante) à deux salinités (15 et 30 PSU), pour deux conditions de nourrissage (avec et sans), exprimées en ng.g⁻¹ de tissus secs

Lorsque les organismes sont nourris, les écarts types sur les mesures sont grands et mènent à des différences non significatives même s'il semble y avoir une accumulation plus importante après exposition au nanoproduit et au nanomatériau. La présence d'algue, et donc de nourriture dans le milieu, augmenterait la prise d'argent par *S. plana* et son accumulation dans la glande digestive. Il se pourrait que les algues en incorporant de l'argent, soit sous forme ionique, soit sous forme nanoparticulaire, transfèrent la contamination à leur consommateur mais cela reste très limité étant donné le temps de contact relativement court. Par contre, l'adsorption des nanoparticules aux algues ensuite consommées peut être une hypothèse à privilégier. Tout comme la présence de nourriture dans le milieu pourrait augmenter l'activité de filtration de *S. plana* qui y trouverait un intérêt pour s'alimenter, intérêt qu'elle n'aurait pas en absence de nourriture. Cette accentuation de la filtration engendrerait une exposition plus importante à la contamination en argent, quel que soit la forme, et *in fine* à une plus grande bioaccumulation.

III.4.2 Exposition par contamination de l'alimentation

Afin de mettre en évidence l'importance de l'exposition par voie alimentaire et un effet de la forme de contamination métallique sur le transfert de contamination le long de la chaîne trophique, d'autres organismes d'*H. diversicolor* ont été nourris avec des morceaux des organismes de cette même espèce préalablement exposés aux deux formes de cadmium (Cd²⁺ et nanoparticules de CdS). Les morceaux de vers exposés ont été congelés et apportés comme nourriture, chaque 2 jours, à d'autres vers lors d'une autre exposition menée sur 14 jours.

En prenant en compte la quantité de cadmium initiale dans les organismes donnés comme nourriture, déterminée lors de l'étude de la bioaccumulation suite à une contamination de l'eau, aucune influence de la forme n'a été mise en évidence sur le transfert de contamination en cadmium. En effet, après 14 jours d'alimentation en laboratoire, les teneurs en cadmium des organismes nourris selon les deux conditions ne montrent pas des teneurs en cadmium significativement différentes l'une de l'autre (Cd^{2+} : $75 \pm 42 \text{ ng.g}^{-1}$; CdS NP: $71 \pm 26 \text{ ng.g}^{-1}$), mais aussi des teneurs des organismes contrôles ($62 \pm 16 \text{ ng.g}^{-1}$). Dans des conditions d'exposition relativement courtes, l'exposition directe des organismes via la contamination de l'eau engendre une bioaccumulation supérieure à l'exposition par le biais de l'alimentation.

Ces travaux ont fait l'objet de

6 articles : A7, A10, A12, A13, A15, A21

6 communications orales : CO10, CO11, CO12, CO15, CO16, CO21

III.5. Bilan sur les nanoparticules métalliques

À travers les différentes études réalisées en milieux contrôlés qui mettent en œuvre des contaminations en métaux sous différentes formes et des expositions d'organismes modèles endobenthiques, des données ont été acquises sur le devenir des contaminants et l'imprégnation des espèces. Le devenir des nanoparticules métalliques est dépendant des caractéristiques intrinsèques de la nanoparticule comme la nature du métal, la taille et la capacité d'agrégation. Si les nanoparticules d'argent utilisées ont plutôt tendance à se dissoudre, ce n'est pas le cas des nanoparticules d'oxyde de cuivre qui restent principalement sous forme nanoparticulaire et des nanoparticules de sulfure de cadmium qui ont un comportement intermédiaire.

Par ailleurs, les caractéristiques du milieu engendrent également des différences sur la biodisponibilité et l'imprégnation des organismes. Le dispositif d'exposition en laboratoire est un critère qui joue également un rôle sur les résultats. Les mêmes expérimentations réalisées en aquarium et en mésocosme avec les nanoparticules de cuivre n'ont pas mené aux mêmes résultats. Cela traduit l'importance de travailler avec des conditions les plus proches possible du milieu environnemental dans un contexte d'évaluation des risques.

L'imprégnation des organismes exposés et les effets potentiels engendrés sont inhérents au devenir des contaminants, entre autres à la capacité de dissolution ou non des nanoparticules. Un effet de la forme métallique sur la bioaccumulation des organismes a été relevé dans certaines expériences, notamment avec le cuivre, tout comme des différences interspécifiques. Le choix des organismes à utiliser dans les études d'exposition en laboratoire est donc central.

Finalement d'autres critères comme la salinité du milieu et le nourrissage des organismes se sont avérés impacter la bioaccumulation des métaux par les organismes. Cela met encore plus en exergue la difficulté de mettre en œuvre des méthodes standardisées pour évaluer les risques environnementaux associés aux nanoparticules métalliques. Outre la quantité innombrable de nanoparticules, nanomatériaux et nanoproduits utilisés par les industriels (nature, taille, capacité d'agrégation, etc.), les nombreux critères à prendre en compte pour l'évaluation des risques constituent des véritables verrous.

Ces travaux de recherche, et les résultats sur les effets sur les organismes étudiés en parallèle et non présentés ici contribuent à mettre en évidence que des recherches écotoxicologiques doivent continuer à être réalisées sur les contaminants émergents que sont les nanoparticules. Ils pourraient aussi être utilisés dans un but de modélisation. Le but, à terme, serait d'arriver à établir une réglementation de l'utilisation de ces produits par les industriels en lien avec les réels risques encourus par l'environnement.

La dernière partie de ce chapitre traitera d'une autre famille de contaminants qui ont un point commun à la fois avec les HAP et les nanoparticules métalliques, puisqu'ils sont organiques et sous forme particulière : les microplastiques.

IV. Les microplastiques

En 2014, alors que mon recrutement au laboratoire MMS date de près de 4 ans, l'idée de développer un nouveau champ d'investigation dans la thématique écotoxicologique de l'équipe ECEm me traverse l'esprit. Afin de m'insérer dans la mouvance écotoxicologique du moment, je me lance dans l'écriture d'une réponse à appel à projets ANR JCJC sur les microplastiques appelé MIPPOP pour « MICroPlastic and POP pollution: exposure, bioaccumulation and biological effects on *Mytilus edulis* », que j'ai soumise à candidature en septembre 2014 en tant que porteuse du projet.

Malheureusement, cette proposition n'a pas passé le premier tour des sélections de l'ANR. Au sein de l'équipe, nous décidons de la retravailler pour la soumettre à l'appel à projets pari scientifique régional. Pour des raisons politiques et stratégiques, le projet MiPlAqua pour « Approche combinée terrain/laboratoire pour l'évaluation de l'impact des microplastiques sur des organismes aquatiques d'intérêt socio-économique (moules, huîtres) » a été déposé sous la tutelle de l'Université Catholique de l'Ouest, Catherine Mouneyrac devenant la porteuse. Dans le même temps, Nam Ngoc Phuong, l'étudiant vietnamien que j'ai encadré en stage de Master 2, m'annonçait son souhait de réaliser une thèse, que je co-encadrerai, sur un sujet libre étant donné qu'il bénéficiait d'une bourse du gouvernement de son pays d'origine. Après discussion au sein de l'équipe, nous lui avons proposé de travailler sur les microplastiques afin de pouvoir initier ce volet de recherche. Finalement, le projet MiPlAqua, envisagé pour 3 ans, a été retenu par la région Pays de la Loire et la bourse de thèse de Nam Ngoc Phuong est venue en complément de ce financement. Le projet a débuté en milieu d'année 2015 alors que Nam Ngoc Phuong avait commencé à travailler sur le sujet en janvier, en rédigeant notamment une revue d'articles. Les volets que comportait ce projet étaient : (i) l'évaluation de la contamination en microplastiques de la zone côtière régionale au niveau des sédiments des vasières intertidales et de 2 espèces d'intérêt socio-économique que sont la moule bleue (*Mytilus edulis*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), (ii) l'exposition en laboratoire de ces espèces afin d'évaluer les effets de ces contaminants et (iii) l'adsorption de molécules organiques à leur surface pour évaluer leur rôle de vecteur de contamination organique (Phuong, 2018).

Ce troisième chapitre est donc consacré à ces contaminants émergents, avec une première partie qui les présente, une deuxième partie qui traite de la mise au point de méthodes d'analyse des microplastiques contenues dans une espèce marine : la moule, et dans les sédiments des vasières intertidales, pour finir avec une dernière partie qui expose la contamination des moules, des huîtres et des sédiments collectés sur le littoral de la région des Pays de la Loire.

IV.I. Présentation des microplastiques

Comme le montre la Figure 27, l'arrivée des microplastiques dans le champ d'investigation des scientifiques du domaine environnemental est beaucoup plus récente que celle des HAP, mais également que celle des nanoparticules métalliques. L'engouement de la communauté scientifique pour ces contaminants émergents commence à se voir en 2015, année à partir de laquelle le nombre d'articles scientifiques à leur sujet a dépassé la centaine par an dans les domaines de l'environnement, la biologie, la chimie, la médecine, la toxicologie de Science Direct. Ces deux dernières années, le nombre d'études sur les microplastiques a généré près du double d'articles par an. Il est passé de 340 articles en 2017 à 615 en 2018. La compétition est rude avec une nécessité de veille scientifique constante et une valorisation des résultats rapides.

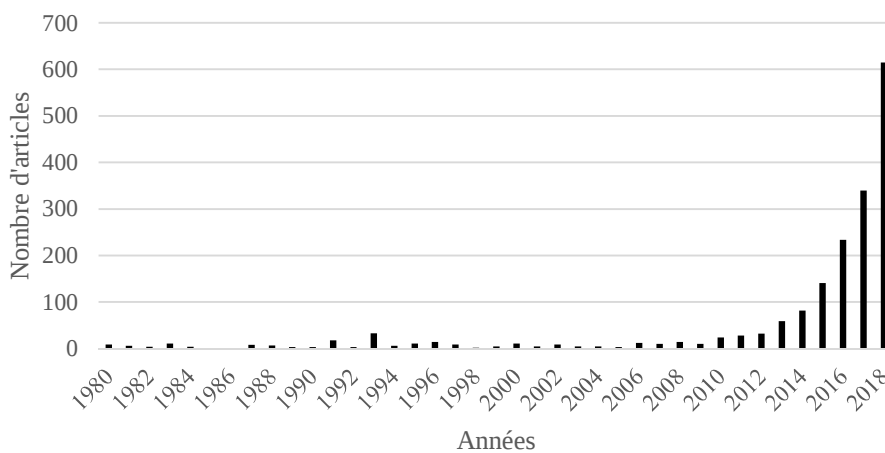


Figure 27 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [microplastic ^ environnement] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)

D'un point de vue définition, les scientifiques s'accordent pour dire que les microplastiques sont constitués de différents matériaux plastiques ayant une taille inférieure à 5 mm (Arthur et al., 2009). Ils sont issus de deux principales sources. La source primaire correspond aux microplastiques utilisés par l'homme en tant que tel, sous la forme de fibres, de granulés ou de microbilles qui peuvent être incorporés dans de nombreux produits cosmétiques par exemple, comme des dentifrices, des crèmes de gommages, etc. (Andrady, 2011). Cette source de contamination primaire a été réglementée dans les cosmétiques à rincer. En France, les microbilles de plastiques ont été interdites dans la loi sur la biodiversité de juillet 2016 et la mesure a pris effet au 1^{er} janvier 2018. Même si la source de contamination primaire n'est pas négligeable, elle commence à être considérée avec une volonté politique de la limiter, alors que la source secondaire semble être beaucoup plus préoccupante. En effet, la source de contamination secondaire correspond au fractionnement des déchets plastiques qui se trouvent dans les milieux naturels (Andrady, 2011 ; Costa et al., 2010 ; Zettler et al., 2013).

Le plastique entre dans la composition de la plupart des objets de notre quotidien, leur production mondiale atteint plusieurs centaines de millions de tonnes chaque année, avec une croissance d'année en année. Ce matériau présente de nombreux avantages, comme leur faible

coût de production, leur légèreté, leur résistance à l'eau, la corrosion, leur inertie chimique, leur caractère isolant thermique et électrique, etc (Andrady and Neal, 2009). Cependant, les objets plastiques sont également difficilement recyclables et des quantités de l'ordre de la dizaine de millions de tonnes arrivent dans les océans chaque année, formant pour près de 60 à 80 % des plaques de déchets, en certains endroits du globe, comme celle appelée le septième continent dans le nord de l'océan pacifique, qui a une superficie de plus de 3 fois celle de la France. Une fois dans le milieu, les déchets plastiques sous l'action mécanique (vents, courants marins, etc.), chimique (eaux, rayonnements UV, etc.) et biologique (biodégradation) se déforment et se fragmentent. Ce fractionnement de plus en plus prononcé entraîne la formation de microplastiques (Andrady, 2011 ; Costa et al., 2010 ; Zettler et al., 2013) qui attirent autant l'attention des scientifiques ces 3 dernières années, et pour cause.

Une fois sous une taille micrométrique, les plastiques flottants peuvent évoluer sur de longues distances grâce aux courants et aux vents marins atteignant les plages, alors que les plastiques qui coulent s'accumulent plutôt dans le fond des milieux aquatiques, au niveau des sédiments (Engler, 2012; Thompson et al., 2009). Les organismes aquatiques sont alors exposés à ces microplastiques qui ont la caractéristique d'être ubiquistes et persistants. En fonction de leur taille, leur forme, leur couleur, leur nature, les microplastiques peuvent être ingérés par les organismes (Desforges et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Certains organismes s'imprègnent de ces microplastiques inévitablement, alors que d'autres s'alimentent volontairement de ces derniers à cause d'une confusion avec leur alimentation habituelle. Des phénomènes de déjection ou d'accumulation apparaissent. L'impact potentiel de ces microplastiques sur l'environnement est méconnu. Ils pourraient être une menace pour les organismes et les écosystèmes marins, tout comme un risque pour la santé de l'homme, étant donné que celui-ci consomme de nombreux produits de la mer de façon régulière.

Une autre problématique environnementale des microplastiques est leur rôle de vecteur de contamination organique et métallique (Ogata et al., 2009 ; Rios et al., 2007 ; Teuten et al., 2007). Ce phénomène peut être étudié sous 2 angles bien distincts. Le premier angle consiste à considérer que des additifs sont ajoutés aux plastiques, dans la plupart des cas, et à des hauteurs variables dès leur fabrication. Ces additifs vont jouer un rôle sur l'esthétisme, la stabilité, le coût, la plasticité, l'ignifugation, etc. Ils peuvent être de nature organique, comme les phtalates, le bisphénol A, les retardateurs de flamme bromés (polybromodiphényléthers : PBDE, hexabromocyclododécane : HBCD) déjà connus et recherchés dans l'environnement à cause de leur caractère perturbateur endocrinien. Une fois sous l'action mécanique, chimique et biologique du milieu naturel, les plastiques se fractionnent et les additifs contenus dans ces derniers sont relargués dans le milieu et/ou dans les organismes marins. Ainsi, il existe non seulement une contamination directe et physique par les microplastiques, mais également une contamination indirecte et chimique liée au transfert des additifs du plastique vers les différents compartiments environnementaux. Le deuxième angle de considération du rôle de vecteur des microplastiques est leur caractère hydrophobe additionné à leur grande surface spécifique qui leur confère une grande capacité à sorber les contaminants organiques hydrophobes du milieu environnemental. Ce sont de véritables réservoirs mais qui restent toutefois minimes par rapport aux teneurs présentes sur la phase particulaire organique et inorganique naturelle.

IV.2. Les difficultés de l'analyse des microplastiques dans l'environnement

De nombreuses études ont porté sur l'évaluation de la contamination en microplastiques dans les eaux et les sédiments du milieu marin. Les résultats quantitatifs globaux des eaux et des sédiments sont donnés dans les Tableaux 12 et 13 jusqu'en 2018 après mise à jour des données de la revue d'articles A19.

Tableau 12 : Résultats quantitatifs globaux de la contamination en microplastiques dans les eaux marines (47 études référencées) d'après la revue d'article A19

	Nombre d'études	Quantités retrouvées
Amérique	6 en océan Atlantique	1 400 à 700 000 /km ²
	12 en océan Pacifique	0,004 à 9 200 /m ³
	1 en mer des Caraïbes	
Asie	2 au golfe arabe et Qatar	87 000 à 1 460 000 /km ²
	4 au Japon, Indonésie, Chine	0,08 à 0,73 /m ³
Afrique	1 en Namibie et Maroc	6 à 8,5 /m ³
Australie	2 études	3 700 à 8 966 /km ²
Europe	2 en mer Méditerranée	62 à 7.10 ⁶ /km ²
	2 en mer du Nord	< 0,04 à 700 m ³
	7 en océan Atlantique	50 à 100 fibres/litre
	8 autres mers	

Tableau 13 : Résultats quantitatifs globaux de la contamination en microplastiques dans les sédiments et sables marins (60 études référencées) d'après la revue d'article A19

	Nombre d'études	Quantités retrouvées
Amérique		<10 à >5000/m
	7 sur sédiment	15 à 69 000 kg
	7 sur sable	43 à 214 /litre
		25 à 160 /m ²
		248 /m ³
Asie	7 sur sédiment	37 à 1900 /kg
	10 sur sable	8 à 80 000 /m ²
		4137 à 26 000 /m ³
Afrique	2 sur sédiment	81 mg/kg
Australie	1 sur sable	401 à 3300 /kg
	1 sur sédiment	>1000/m
Europe		3400 /L
	21 sur sédiment	0,3 à 6 695 /kg
	4 sur sable	>10 à 350 /litre
		5 à >1000 /m ²

Parmi les 47 études référencées dans le tableau 13 sur les milieux marins, seulement 21 mentionnent le type de plastiques, qui s'avère être plutôt du polyéthylène (PE) et du polypropylène (PP). En ce qui concerne les sédiments/sables, près de la moitié des 60 études donnent le type de microplastiques qui est principalement du PE et du PS également. Cette nature de plastique est en accord avec les quantités produites industriellement.

En s'intéressant aux valeurs données dans les tableaux, il est possible de faire deux principaux constats. Le premier est que l'unité d'expression des résultats n'est pas homogène dans toutes les études, ce qui rend difficile leur comparaison. Ces différentes unités d'expression des résultats sont dépendantes des moyens d'échantillonnage. Par exemple, pour les eaux marines, si les microplastiques sont collectés à l'aide d'un filet Manta leur nombre sera donné en fonction d'une unité de surface, alors que si des tamis et/ou des filtres sont employés alors le résultat sera exprimé par unité volumétrique. De plus, alors que le filet Manta ne retient que les particules supérieures à 330 μm , la filtration de l'eau permet de retenir des particules plus petites avec le gros inconvénient du colmatage et des quantités d'eau étudiées beaucoup plus limitées. Pour ce qui est du sédiment, les outils de prélèvements vont également varier en fonction de la zone d'étude, si elle est accessible à marée basse ou non. Ainsi, si le sédiment n'est jamais à découvert, l'utilisation d'un filet de fond ou d'une benne est indispensable, alors qu'à marée basse, le prélèvement peut se faire à la benne ou à la spatule. Les résultats seront ainsi exprimés par unité de surface (filet de fond), par unité de volume ou de masse (benne et spatule). Le deuxième constat est l'importante hétérogénéité des résultats. Il est fort probable que les contaminations en microplastiques soient dépendantes de la localisation des zones de prélèvements. Mais cette importante hétérogénéité peut aussi être attribuée aux différentes techniques de prélèvement des échantillons comme cela vient d'être discuté, aux différentes techniques de préparation d'échantillons et aux différentes méthodes analytiques qui peuvent être employées.

Les techniques de préparation d'échantillons et les méthodes analytiques employées ont également un impact sur l'hétérogénéité des résultats retrouvés dans les matrices biologiques. À ce propos, plus de 40 espèces ont déjà été étudiées et l'hétérogénéité observée est également due à des différences spatio-temporelles, inter-spécifiques et intra-spécifiques. Contrairement aux eaux marines et aux sédiments, pour ce type de matrice, les outils de prélèvement des échantillons ne seront pas une source de variabilité des résultats entre les études. De plus, les résultats sont bien souvent exprimés selon deux unités : en nombre par individu ou en nombre par masse de poids frais ou sec.

Pour revenir aux préparations d'échantillons, les points critiques se trouvent dans les différentes étapes que sont la digestion, la sédimentation et la filtration. Plusieurs réactifs (acides, bases, oxydants, enzymes, solutions hypersalines, etc.) et plusieurs filtres (nature, taille, porosité) peuvent être employés et cela impacte inévitablement le résultat final. Par exemple, certains réactifs employés lors de la digestion peuvent dissoudre les particules de nylon. Lors de l'étape de sédimentation, l'utilisation d'une solution insuffisamment dense peut entraîner la perte des microplastiques les plus denses (PVC, PET...). De même pour les filtres, si leur porosité est trop grande, il est possible de perdre les microplastiques les plus petits, mais à l'inverse, une porosité trop faible peut retenir la matière organique qui limite l'observation des filtres au microscope et l'identification des microplastiques. Les choix doivent être réfléchis en fonction du type de matrice, mais aussi en fonction de la méthode d'analyse qui suit et la procédure analytique doit être validée dans son ensemble avec des dopages.

Les principales méthodes d'analyse qui apparaissent dans la littérature sont l'observation microscopique seule ou couplée à la spectroscopie Raman ou Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR) en mode transmission ou réflexion. À propos de ces méthodes, il s'avère que l'observation microscopique seule est insuffisante pour l'analyse des

microplastiques. En effet, dans toutes les études qui ne caractérisent pas les microplastiques, d'autres types de particules sont inévitablement comptabilisés, car il est impossible de définir la nature d'une particule en l'observant seulement, même microscopiquement. Les résultats sont surestimés et correspondent la plupart du temps aux valeurs extrêmes hautes de la littérature. En ce qui concerne la spectroscopie Raman, le principal avantage par rapport à la spectroscopie FT-IR est que la résolution est meilleure (de l'ordre du μm), ce qui conduit à l'identification de microplastiques de plus petites tailles. Malgré cet avantage, le temps d'analyse d'un filtre est extrêmement long (plusieurs dizaines d'heures), ce qui est moins le cas en spectroscopie FT-IR (environ 2 heures), même si l'identification de particules inférieures à 20 μm est impossible.

Une autre source d'hétérogénéité des résultats peut être la contamination croisée, notamment dans les études qui retrouvent de nombreuses fibres sans aller jusqu'à leur identification. Il est possible que des fibres issues des vêtements, de l'air ambiant, etc. contaminent les filtres. L'analyse de blancs négatifs, c'est-à-dire ayant subi la procédure analytique sans échantillon, est donc indispensable pour vérifier cette éventualité.

Pour finir sur cette analyse de la littérature sur l'évaluation de la contamination en microplastiques dans l'environnement, il semble indispensable que des protocoles standardisés soient mis au point et proposés à la communauté scientifique afin de pouvoir comparer les résultats les uns aux autres et véritablement pouvoir juger d'une variation spatio-temporelle de la contamination à l'échelle du globe.

Ces travaux ont fait l'objet de
1 revue d'articles : A19
1 communication orale : CO22

IV.3. La mise au point des procédures d'analyse des microplastiques

Tout comme expliqué précédemment, une attention particulière doit être apportée à la mise au point d'une procédure d'analyse des microplastiques dans les matrices environnementales. Ces mises au point ont été réalisées au laboratoire pour l'étude de la contamination en microplastiques des moules bleues (*Mytilus edulis*), des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) des sédiments de vasières intertidales. Le but a été de préparer l'échantillon afin de permettre l'analyse quantitative et qualitative directe des microplastiques sur filtre par microscopie couplée à un spectromètre FT-IR.

Différentes étapes se succèdent comme le montre le Tableau 14 et pour chacune d'elle, des essais ont été réalisés pour améliorer les performances de la méthode analytique.

Tableau 14 : Points testés des étapes clés de la préparation des échantillons de moules

Etape de	Tests portant sur	Intérêt	Limite
Digestion	les réactifs (HNO ₃ , KOH, H ₂ O ₂ ...), leur volume, les temps de contact de chauffe et d'agitation	Limiter la matière organique et minérale sur les	Altération ou disparition des microplastiques
Sédimentation	l'ajout d'une ou plusieurs étapes de sédimentation	filtres facilitant l'observation microscopique et l'identification	Élimination des microplastiques en fonction de leur densité
Filtration	différentes natures, porosités et tailles de filtres	spectroscopique des microplastiques	Élimination des microplastiques les plus petits et adéquation avec l'analyse FT-IR

IV.3.1 Protocole de préparation des échantillons de moules

Après différents essais, une procédure de validation par dopages avec des microplastiques de 3 types (PE, PP et polychlorure de vinyle (PVC)) et la réalisation de blancs, un protocole d'analyse des microplastiques dans les moules a été établi. Il est donné dans la Figure 28 et est publié dans l'article A22.

La moule est constituée en grande majorité de matière organique. L'étape de digestion est donc indispensable et réalisée à chaud et sous agitation dans du KOH (10%) après avoir décongelé et ôté la coquille des organismes. Le KOH s'est avéré être le meilleur compromis en termes de préservation des microplastiques et d'efficacité de digestion. Puis, une étape de multi-sédimentation suit avec l'utilisation de KI (50%) qui est une solution hypersaline, donc dense, qui permet de séparer le restant de matrice non digéré et les sables des microplastiques qui se trouvent alors dans une solution filtrée sur un filtre de nitrate de cellulose de 25 mm de diamètre et 12 µm de porosité. Ce choix de filtre a été fait en considérant la résolution de 20 µm et le fonctionnement de l'appareillage analytique en mode réflexion utilisé ensuite pour l'identification des microplastiques. Le faible diamètre permet une analyse plus rapide de sa surface.

Les taux de recouvrement des 20 microplastiques par type de plastique ajoutés à la matrice pour la validation de la méthode sont en moyenne ($n = 3$) de $98 \pm 5\%$, $70 \pm 21\%$ et $85 \pm 5\%$ pour PE, PP et PVC respectivement. Dans les 3 blancs, une seule particule qui n'est pas faite de matière plastique a été retrouvée.

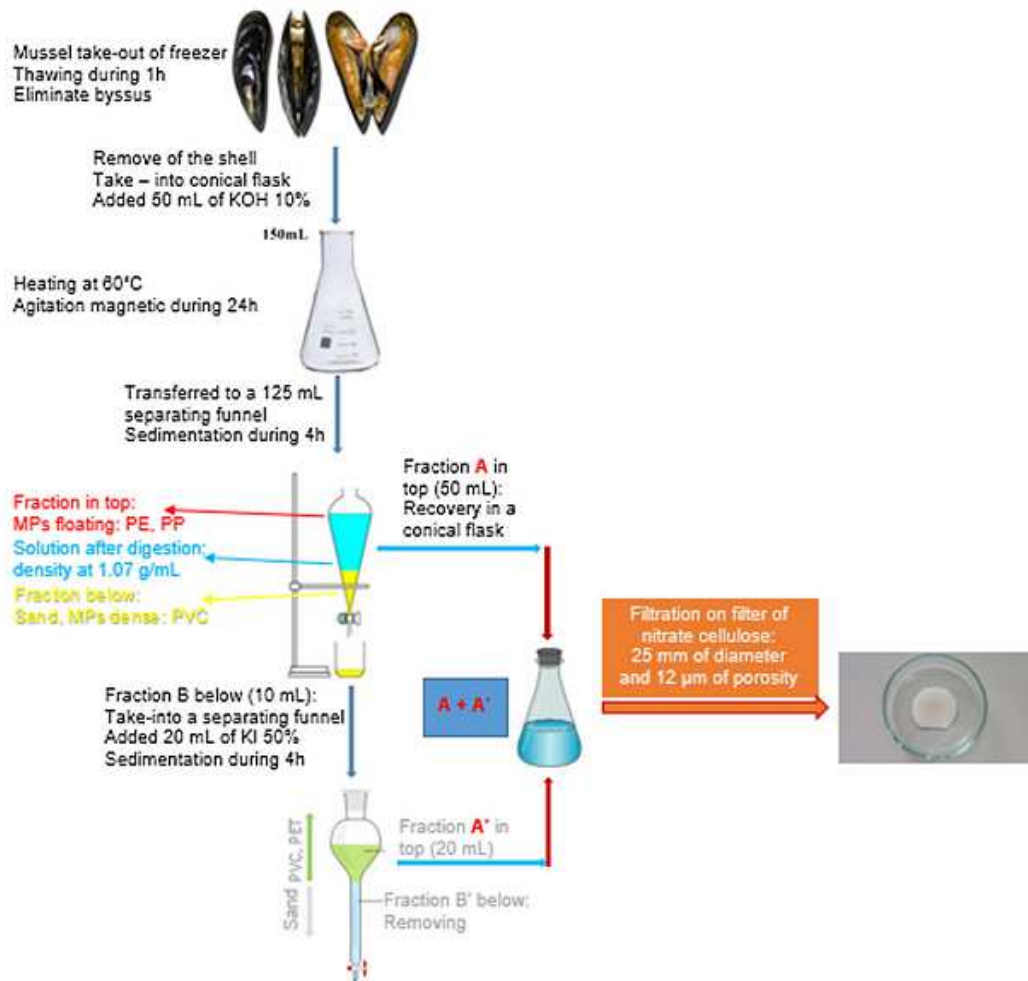


Figure 28 : Procédure de préparation des échantillons de moules (d'après l'article A22)

IV.3.2 Protocole de préparation des échantillons de sédiment

Un protocole final d'analyse des microplastiques dans les sédiments de vasières intertidales a été établi après différents essais, une procédure de validation par dopages avec des microplastiques de 4 types (PE, PP, PVC et polyéthylène téréphtalate (PET)) et des blancs. Il a été publié dans l'article A24.

La prise d'essai de départ était de 25 g de sédiment, qui ont tout d'abord été séchés et tamisés à 1 mm après décongélation. Les deux fractions ont ensuite été analysées séparément. Contrairement aux organismes, une étape de digestion n'a pas été nécessaire. Pour ce qui est l'étape de sédimentation, elle a été réalisée à l'aide d'une centrifugation avec de l'eau milliQ, à 18°C, pendant 5 minutes à 500 tours par minute. Le surnageant récupéré à la pipette Pasteur a été filtré sur le même filtre que pour les organismes (filtre de nitrate de cellulose de 25 mm de diamètre et 12 µm de porosité), pour les mêmes raisons. Les avantages de cette méthode résident dans sa facilité de mise en place, son faible coût, son temps de réalisation limité et sa préservation de l'environnement par l'utilisation d'aucun produit chimique.

Les taux de recouvrement des 10 microplastiques par type de plastique ajoutés à la matrice pour la validation de la méthode sont en moyenne ($n = 3$) de 107%, 83%, 93% et 83% pour PE, PP, PVC et PET respectivement. Dans les 10 blancs, une seule particule qui n'est pas faite de matière plastique a été retrouvée.

IV.3.3 Analyse des filtres par spectroscopie FT-IR

L'identification et la caractérisation des microplastiques présents sur les filtres issus des préparations d'échantillon, que ce soit moules ou sédiments, ont été réalisés par spectroscopie FT-IR en mode réflexion. Chaque surface des filtres a entièrement été observée microscopiquement. Puis, la taille, la couleur et la forme ont pu être déterminés pour toutes les particules observées et ayant une taille supérieure à 20 μm . Enfin, la nature de la matière plastique a été déterminée après comparaison des spectres à une bibliothèque et un score de recherche supérieur à 60%. Ce travail a donc permis de mettre en place un protocole et qualitatif et quantitatif éventuellement standardisable.

Ces travaux ont fait l'objet de

2 articles : A22 et A24

1 communication orale : CO18

2 posters : P19 et P23

IV.4. Les microplastiques dans l'environnement côtier des Pays de la Loire

Après avoir mis au point les procédures d'analyse quantitative et qualitative des microplastiques dans des matrices biologiques et sédimentaires, elles ont été appliquées aux échantillons de sédiments, de moules, mais aussi d'huîtres, prélevés sur le littoral de la région des Pays de la Loire. Les sédiments et les huîtres ont été prélevés en trois sites : Pen-Bé, Coupelasse et le nord de la baie de l'Aiguillon (Figure 29). La répartition des moules étant plus limitée que celle des huîtres, les moules ont été collectées à deux sites seulement : Pen-Bé et la baie de l'Aiguillon.



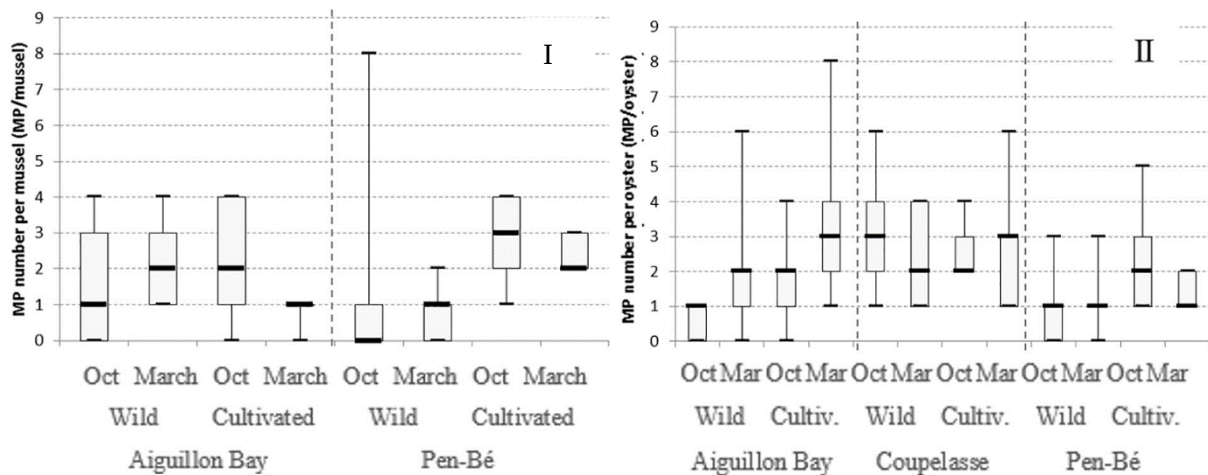
Figure 29 : Points d'échantillonnage de la côte de la région Pays de la Loire

Le choix des sites a été décidé conjointement avec l'équipe d'écotoxicologie d'IFREMER Nantes qui a également participé à l'échantillonnage. En plus de la variation spatiale de la contamination, ces prélèvements ont aussi eu lieu à deux saisons : automne et printemps, afin de mettre en évidence un potentiel effet temporel. De plus, pour chaque espèce de bivalves, des individus cultivés et d'autres sauvages ont été récoltés pour étudier un potentiel effet de leur mode de vie sur leur contamination en microplastiques.

IV.4.1 Les moules et les huîtres

Les moules et les huîtres sont les matrices biologiques étudiées dans le cadre de cette étude, car elles présentent des intérêts écologiques, biologiques et socio-économiques. Les résultats sont publiés dans l'article A23. Ces espèces ont été choisies, car elles se nourrissent des matières en suspension dans l'eau par une activité de filtration importante. Elles ont une large distribution géographique, un mode de vie sédentaire, sont bien représentées et sont également consommées par l'homme. Ce sont donc de bons bioindicateurs de la qualité des eaux et la moule est déjà utilisée en tant que telle dans des réseaux de surveillance. Au niveau de la région des Pays de la Loire, ces espèces sont cultivées à hauteur de 16 000 tonnes et exportées pour une consommation nationale moyenne de 10 kg /an /habitant.

Les résultats quantitatifs des microplastiques contenus dans les moules et les huîtres sont présentés dans la Figure 30 en nombre par individu. Au total, 120 moules (par lots de 3) et 60 huîtres (individuelles) ont été analysées.



Aucune différence quantitative significative n'a été observée entre les saisons d'échantillonnage et les deux ou trois sites d'échantillonnage, respectivement pour les moules et les huîtres, sur les côtes de la région Pays de la Loire, même si ces sites sont séparés d'environ 140 km. Les quantités retrouvées sont comparables à celles d'autres études antérieures, même si les protocoles de préparation d'échantillon et les méthodes d'analyse sont différents (De Witte et al., 2014, Van Cauwenberghe and Janssen, 2014, Vandermeersch et al., 2015). Mathalon and Hill (2014) ont montré différents niveaux de contamination entre des moules sauvages et

cultivées, ce qui n'est pas le cas dans cette étude, même si environ 90% des moules cultivées contenaient des microplastiques contre seulement 60% des moules sauvages. La plus grande fréquence de contamination des moules cultivées s'explique peut-être par une exposition accentuée aux microplastiques provenant de la dégradation des matières plastiques (PE, PP, polyester) utilisées en mytiliculture et conchyliculture comme des cordes, filets et tuyaux.

Au regard des résultats quantitatifs globaux, une grande variation de contamination par individu est observée entre les moules et les huîtres, avec respectivement $0,608 \pm 0,564$ et $2,10 \pm 1,71$ microplastiques par individu. Cependant, en exprimant les résultats en microplastiques par gramme de tissus mous frais, les résultats ne sont plus si différents, avec $0,228 \pm 0,197$ et $0,158 \pm 0,160$ microplastiques/g respectivement pour les moules et les huîtres. Les différences de quantités par individu de moules et d'huîtres peuvent s'expliquer par les taux de filtration qui atteignent jusqu'à 1,8 L/heure chez la moule (Clausen and Riisgard, 1996) et 5 L/heure chez l'huître (Barillé et al., 1997). En filtrant plus de deux fois plus que les moules, les huîtres sont plus exposées aux microplastiques conduisant à une plus grande bioaccumulation par individu.

En ce qui concerne les résultats qualitatifs, ils sont représentés dans la Figure 31 pour les deux espèces. Malgré une production mondiale de PVC d'environ 10% (PlasticsEurope, 2015), ce type de plastique n'est pas retrouvé dans les moules et les huîtres étudiées, ce qui est aussi montré dans la littérature. Pour les deux espèces de bivalves, les microplastiques sont en majorité des fragments et de couleur grise ce qui pourrait appuyer l'hypothèse d'une origine due à la fragmentation des déchets (source secondaire de contamination) et d'un long séjour passé dans l'environnement. En croisant les résultats sur la couleur et le type de microplastiques, tous ceux faits d'acrylonitrile butadiène styrène (ABS) sont de couleur verte. Cela pourrait signifier que ces microplastiques d'ABS proviendraient d'une même source. Ce type de plastique est généralement utilisé dans les jouets et dans l'industrie automobile. À propos de leur taille, les microplastiques sont plus grands que ceux trouvés dans des moules par Van Cauwenberghe and Janssen (2014) qui observent majoritairement des microplastiques inférieurs à 25 μm . Cette différence de tailles retrouvée dans les bivalves peut être attribuée à une contamination en microplastiques différente, mais aussi aux différentes techniques analytiques utilisées. En effet, Van Cauwenberghe and Janssen (2014) ont utilisé la spectroscopie Raman pour l'identification des microplastiques qui permet une meilleure résolution et par conséquent l'identification de microplastiques inférieurs à 20 μm , ce qui est impossible avec la spectroscopie $\mu\text{FT-IR}$.

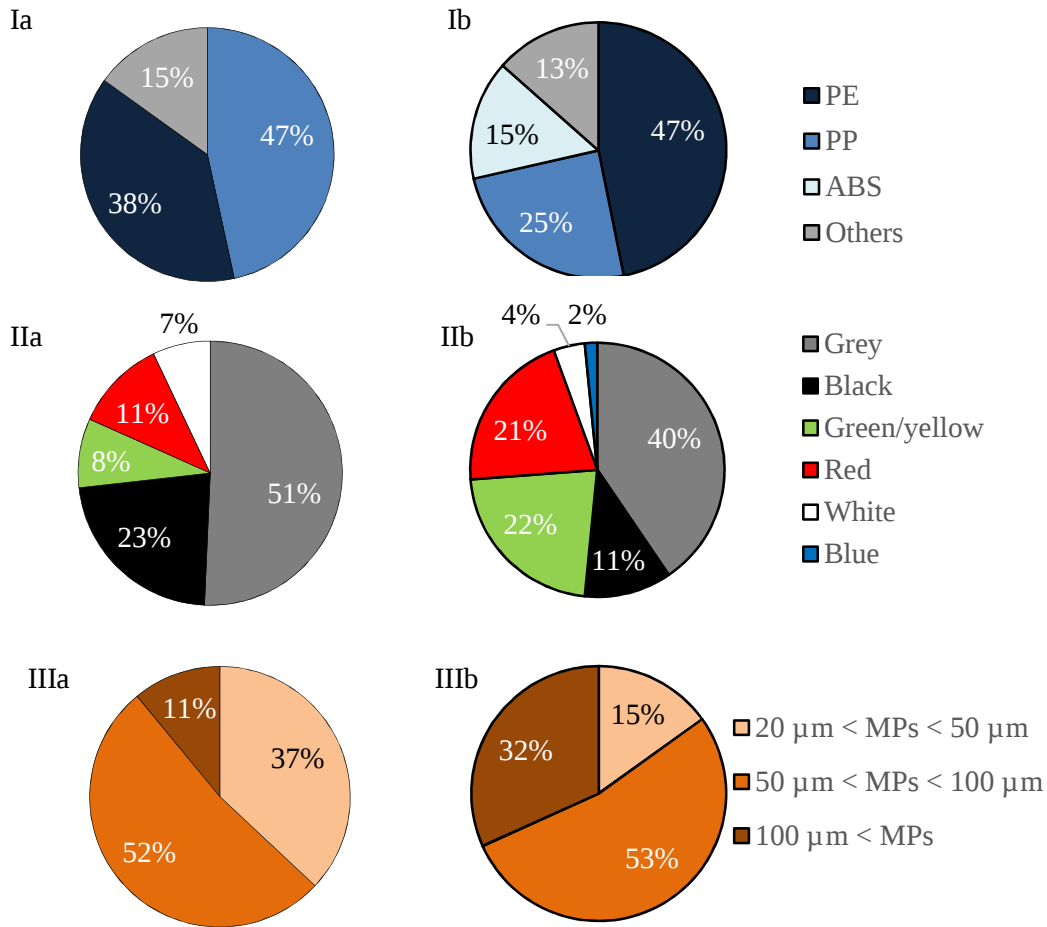


Figure 31 : Analyse qualitative des microplastiques trouvés dans les moules (a) et les huîtres (b). Distribution en fonction du type de plastique (I), de la couleur (II) et de la taille (III)

La Figure 31 montre que le type de plastique prédominant n'est pas le même pour les deux espèces étudiées (Figure 31 : Ia et Ib). Chez la moule, il s'agit du PP, puis de PE, tandis que l'inverse est observé chez l'huître. Une autre différence notable est l'abondance de microplastiques faits d'ABS dans les huîtres (15%) par rapport aux moules (2%). La comparaison des tailles (Figure 31 : IIa et IIb) montre que la proportion de microplastiques de 50 à 100 µm est similaire aux deux espèces (environ 50%) et qu'une inversion est observée pour les autres gammes de taille : les plus petits (de 20 à 50 µm) étant plutôt observés chez la moule et les plus gros (> 100 µm) chez l'huître. Ces différentes distributions de tailles entre les espèces peuvent s'expliquer par la taille des individus (longueur de la coquille de $4,42 \pm 0,48$ et $9,60 \pm 1,53$ cm respectivement pour les moules et les huîtres). Les huîtres possèdent de plus grandes branchies et palpes labiaux qui conduisent probablement à leur imprégnation en de plus grosses particules que les moules. De plus, les plus gros microplastiques retrouvés dans les bivalves mesurent 400 et 1300 µm pour les moules et les huîtres respectivement. Néanmoins, ils devaient être probablement situés à l'extérieur des organismes, car il semble impossible que de si gros fragments puissent pénétrer les branchies et les palpes labiaux.

Enfin, comme pour le volet quantitatif, le site d'échantillonnage, la saison, le mode de vie, ou les combinaisons de ces facteurs, n'ont pas d'effet significatif sur les résultats qualitatifs des microplastiques chez les bivalves.

IV.4.2 Les sédiments

Dans un second temps, les contenus en microplastiques des sédiments issus des mêmes sites que les bivalves, collectés aux mêmes saisons, ont été étudiés.

La prise d'essai en sédiment qui était en adéquation avec la procédure d'analyse était de 25 g. Etant donné qu'elle n'est pas très élevée et limitée à cause de l'étape de centrifugation, une première étude a porté sur la détermination du nombre de réplicats nécessaires à une bonne représentativité des résultats. Ainsi, 20 prises d'essai d'un sédiment échantillonné pris au hasard ont été analysées et la moyenne des réplicats a été calculée après l'ajout successif des résultats de chacune des prises d'essai. La Figure 32 illustre ce qui en résulte et montre qu'il faut au moins 10 réplicats pour assurer une bonne représentativité.

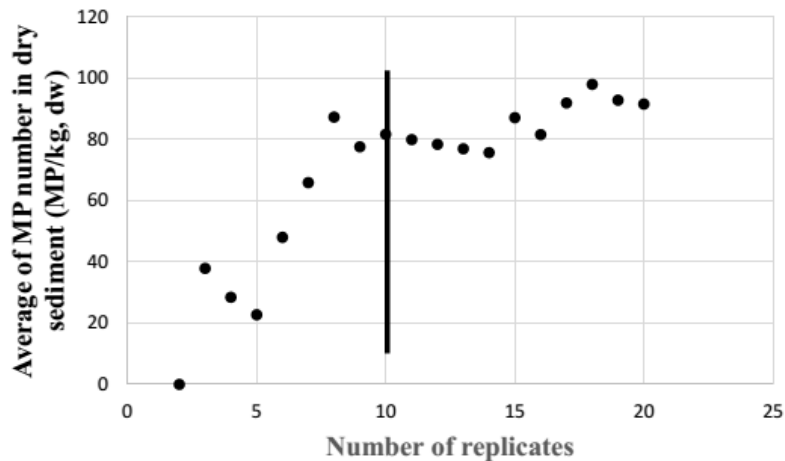


Figure 32 : Moyenne du nombre de microplastiques trouvé dans le sédiment en fonction du nombre de prises d'essai de 25 g analysé

Après avoir pris en compte le nombre de réplicats nécessaire à une bonne représentativité et avoir fait l'analyse des 10 prises d'essai par échantillon de sédiment, des résultats quantitatifs ont été obtenus pour chaque site et saison et sont présentés dans la Figure 33. Au total, une moyenne de 67 ± 76 microplastiques par kg de sédiment sec a été trouvée. Comme pour les bivalves, aucune influence significative spatiale ou temporelle n'a été mise en évidence.

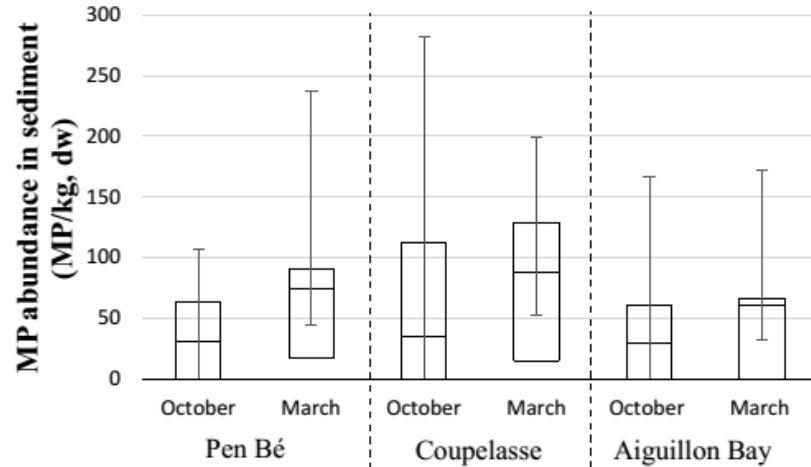


Figure 33 : Abondance des microplastiques dans les sédiments du littoral de la région Pays de la Loire en 3 sites (Pen Bé, Coupelasse, baie de l'Aiguillon) en octobre 2015 (October) et mars 2016 (March), exprimé en nombre par kg de sédiment sec. N = 10 et les boîtes à moustaches représentent le minimum, 1^{er} quartile, médiane, 3^e quartile et maximum

Au niveau qualitatif, les formes des microplastiques retrouvées étaient principalement des fragments à 84% contre 16% de filaments. Les informations collectées sur la nature du polymère, la taille et la couleur sont reportées sur le Figure 34.

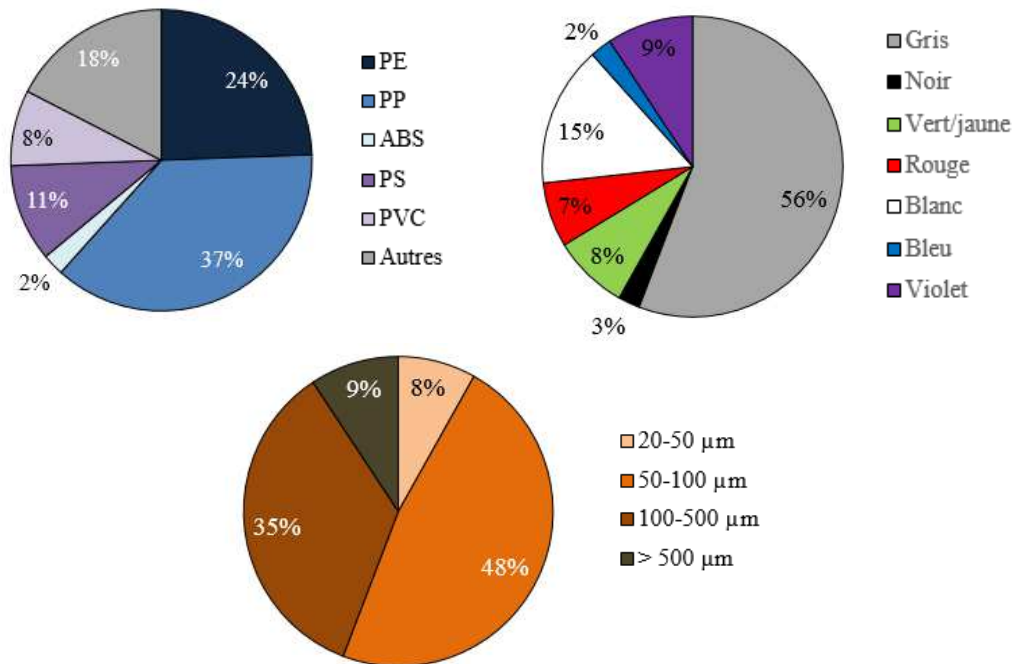


Figure 34 : Analyse qualitative des microplastiques trouvés dans les sédiments. Distribution en fonction du type de plastique (I), de la couleur (II) et de la taille (III)

Un total de dix polymères différents a été retrouvé, parmi lesquels PP et PE sont prédominants, 38% et 24% respectivement. Puis, le PVC, et le polystyrène représentent 9% chacun. Cette composition globale montre une contamination de diverses origines qui semble illustrer la production mondiale et européenne de matières plastiques.

Par ailleurs, il est important de souligner que la présence de microplastiques de PP et PE n'était pas forcément attendue dans les sédiments puisque ce sont des matières plastiques moins denses que l'eau qui devraient flotter. La colonisation de la surface des microplastiques par les microorganismes et les algues, l'adsorption de matières organiques, leur agrégation sont autant de facteurs susceptibles d'augmenter leur densité et engendrer leur sédimentation. En 2015, Enders et al. ont également montré que le processus de sédimentation des microplastiques de taille inférieure à 100 μm peut arriver naturellement, quelle que soit la nature du plastique.

En ce qui concerne la couleur, celles qui étaient prédominantes étaient le gris (60%) et le blanc (13%) qui montre peut-être que les microplastiques se décolorent dans l'environnement. Huit autres couleurs ont également été observées (rouge, vert, noir, bleu, rose et jaune).

Pour ce qui est de la taille, la plus petite taille de particule était la largeur d'une fibre de 40 μm . La majorité des microplastiques avait une taille comprise entre 50 et 100 μm , atteignant 48%. Peu de microplastiques de grande taille ont été observés ce qui corrobore les études de modélisation réalisées sur le transport et la distribution des microplastiques dans le milieu marin en fonction de leur taille (Enders et al., 2015).

Ces travaux ont fait l'objet de

2 articles : A23, A24

3 communications orales : CO23, CO24 et CO25

IV.5. Bilan sur les microplastiques

L'étude bibliographique réalisée sur les microplastiques et valorisée sous la forme d'une revue d'articles a permis de mettre en évidence une grande disparité des résultats reportés sur la contamination environnementale en microplastiques. La grande diversité des méthodes employées pour caractériser la contamination ne permet pas de comparer spatialement les résultats, en mettant par exemple en évidence l'influence de facteurs abiotiques (courants marins, distance de la côte, pression de contamination, etc.). Il semble évident que des standardisations de méthodes sont nécessaires.

Les études expérimentales menées jusqu'ici contribuent à la mise au point de méthodes d'analyse des microplastiques avec toutes les difficultés impliquées au niveau de la digestion de la matière organique, la séparation des microplastiques par densité, la filtration sur des filtres de taille de pores suffisamment petits et l'analyse spectroscopique finale. Deux protocoles sont proposés pour les matrices biologiques et sédimentaires. Celui applicable aux sédiments des vasières intertidales présente l'avantage d'être rapide, facile à mettre en œuvre et respectueux de l'environnement. Cependant, le protocole pour les moules et celui pour les sédiments marins ne sont probablement pas applicables à d'autres types de matrices biologiques comme le poisson ou d'autres sédiments, notamment terrestres.

L'application des protocoles a contribué à l'évaluation de la contamination en microplastiques du milieu côtier de la région des Pays de la Loire, qui n'avait pas encore été investigué. Même si aucune influence spatiale et temporelle n'a été démontrée sur la contamination, peu d'études de la littérature avaient déjà combiné ces deux facteurs. Une autre

originalité des travaux se trouve dans la comparaison des deux espèces de bivalves : moules et huîtres. Ainsi, une différence de la distribution des classes de taille a pu être observée, en concordance avec la taille des individus étudiés, ce qui permet de conclure à une complémentarité de l'étude des deux espèces. En comparant les résultats obtenus pour les compartiments biologique et sédimentaire, les distributions de taille sont également différentes entre les compartiments, ce qui laisse suggérer une potentielle filtration sélective des petits microplastiques ($<100\ \mu\text{m}$) par les bivalves. Ces derniers présentent aussi une accumulation plus importante que le sédiment, ce qui permet de dire que ce sont de bons bioindicateurs de la contamination en microplastiques du milieu marin. Les matières plastiques prépondérantes étaient le PP et le PE, avec une proportion notable d'ABS particulièrement dans les huîtres. Cependant, la variété importante de matières plastiques, de couleurs et de tailles permet difficilement de déterminer la source de ces microplastiques. Seule la forme de fragment apparaît comme un critère relativement constant, quelle que soit la matrice étudiée.

Finalement, les moules et les huîtres étant consommées par l'homme, ces études participent à l'évaluation de son exposition aux microplastiques par voie alimentaire. En considérant une consommation de ces deux espèces à hauteur de 10 kg/an/habitant, une valeur approximative de 240 microplastiques/an/habitant peut être calculée.

Ce chapitre sur la présentation des principaux résultats obtenus durant mes activités de recherche étant achevé, je vais présenter les axes de recherche vers lesquels je souhaite me diriger dans le troisième et dernier chapitre de ce dossier de demande d'Habilitation à Diriger des Recherches.

Troisième partie :

Projets de recherche à venir associés à leur contexte

**DES SOURCES DE CONTAMINATION À L'ÉVALUATION
DE LA QUALITÉ DES MILIEUX**

Le premier chapitre de ce dossier de demande d'Habilitation à Diriger des Recherches a permis de présenter mon CV, associé à mes activités d'enseignement et de recherche. Puis, dans le second chapitre, j'ai exposé les principaux résultats obtenus en termes de contamination environnementale par 3 grandes familles de contaminants : les HAP, les nanoparticules métalliques et les microplastiques. Dans ce troisième et dernier chapitre, je vais maintenant présenter les axes de recherche sur lesquels je projette de travailler à court, moyen et long terme. Ces axes seront présentés selon trois principaux projets auxquels j'associerai leur contexte pour ceux qui ont déjà été initiés. Le premier axe traitera du continuum terre-mer auquel je souhaiterais m'intéresser afin de mieux caractériser les transferts des contaminants continentaux vers le milieu estuarien, voir côtier *in fine*. Puis, la deuxième partie présentera des travaux qui seront réalisés sur des contaminants émergents qui n'étaient encore pas analysés au laboratoire : les terres rares. Pour terminer, je présenterai un projet novateur de développement de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) comme outil de caractérisation de la qualité des milieux environnementaux en s'intéressant aux sédiments et aux organismes marins de type bivalves.

I. Projet continuum terre-mer

Après avoir caractérisé la contamination des zones estuariennes en HAP et des zones côtières en microplastiques, l'idée qui a suivi était d'essayer de mieux comprendre et d'évaluer l'apport continental en ces contaminants. C'est ainsi que nous nous sommes associés au Laboratoire Eau et Environnement (LEE) de l'IFSTTAR et au BRGM pour proposer deux projets, qui ont été réalisés sur 2 années consécutives, sur deux sites se trouvant sur les rives de l'estuaire de la Loire. Le premier projet a été financé par le programme Pollusols et portait sur le site d'une ancienne décharge, située dans la Prairie de Mauves à l'est de Nantes. Le second, financé par l'OSUNA, s'est intéressé à un bassin de rétention des eaux de ruissèlement du pont de Cheviré. Ces deux projets, que j'ai portés, nous ont donné l'opportunité d'initier des collaborations avec l'IFSTTAR et le BRGM. Ils sont, je l'espère, le point de départ de collaborations pérennes avec ces équipes de recherche, le but étant maintenant de proposer ensemble des réponses à appels à projets de plus grande envergure (ANR, EC2CO, etc.) sur cette problématique.

I.1. Étude sur la prairie de Mauves

Cette étude était intitulée « Évaluation du transfert de contaminants organiques de l'ancienne décharge de la Prairie de Mauves vers la Loire ». Dans le cadre du suivi environnemental de l'ancienne décharge de la Prairie de Mauves, de nombreuses interrogations se posent sur le transfert de contaminants à la Loire. Les contaminants issus des déchets stockés peuvent migrer de deux façons : 1) par transfert depuis les lixiviats du massif de déchets vers la nappe alluviale de la Loire sous-jacente, le fond de la décharge n'étant pas étanche ; 2) par infiltration de lixiviats dans le collecteur d'eaux pluviales dans sa partie dégradée située à la base du massif de déchets. Ce dernier se jette ensuite dans un étier rejoignant la Loire. Une remontée d'eau de la Loire dans l'étier en période de forte marée est aussi observée. Le suivi environnemental porte actuellement de façon ponctuelle (2 à 4 campagnes par an) sur les polluants métalliques classiques et quelques familles de polluants organiques (HAP

notamment) présents dans les eaux souterraines. Les résultats acquis ont montré une saisonnalité des transferts. Le suivi ponctuel de polluants émergents a été mené en outre sur 2 années. Il a permis d'en quantifier certains, d'en détecter d'autres, d'autres encore étaient en dessous de la limite de quantification. Ces mesures ponctuelles ne sont pas suffisantes pour caractériser la présence de polluants à très faibles concentrations.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'acquérir des données complémentaires sur le transfert de certains contaminants organiques hydrophobes de la décharge vers la Loire. Cette étude comportait deux volets. Le premier concernait la quantification de contaminants dans les masses d'eaux souterraines et les lixiviats de décharge. Pour cela, des capteurs passifs intégratifs, de type SPMD (semipermeable membrane device) ont été utilisés. Ces outils permettent de concentrer un large spectre de contaminants organiques hydrophobes ($\log K_{ow} > 3$) tels que les HAP, les AP, les PCB, les PBDE et les pesticides organochlorés. Ces capteurs passifs ont été déployés dans quelques piézomètres du réseau de suivi existant sur la Prairie de Mauves. Le second volet de l'étude sur le transfert de contaminants à l'estuaire de la Loire a été de réaliser l'étude quantitative des niveaux de contaminants dans les sédiments de l'étier.

Un échantillonnage permettant une analyse spatiale a été réalisé en parallèle du déploiement des capteurs passifs SPMD lors de la campagne d'échantillonnage faite au mois de mars 2017. Des duplicats d'échantillonneurs passifs ont été déployés dans 5 piézomètres installés sur le site pilote et des sédiments ont été prélevés dans l'étier, en différents points, afin d'assurer une étude de la répartition spatiale des contaminants (récolte du sédiment de surface en triplicats dans 4 zones définies le long de l'étier). Les analyses de HAP et AP ont été réalisées au laboratoire MMS par UPLC-Fluo. L'analyse des PCB, PBDE et des pesticides organochlorés a été sous-traitée à un laboratoire prestataire de services.

Les résultats obtenus à l'aide des capteurs passifs déployés dans les piézomètres du site montrent que l'ancienne décharge de la Prairie de Mauves est une source de contamination en HAP et PCB majeure puisque leurs masses adsorbées sur les SPMD sont bien plus importantes au niveau du piézomètre situé au cœur de la décharge. Les masses de contaminants adsorbées sur les SPMD diminuent ensuite avec l'éloignement à la décharge pour atteindre des valeurs inférieures à celles du puits localisé en amont hydraulique de la décharge, considéré comme référence. La présence de dieldrine détectée au niveau du piézomètre au cœur de la décharge pourrait être due au stockage de déchets verts lorsque la décharge était encore en fonctionnement ou à leur stockage en surface de la décharge, qui est pratiqué depuis de nombreuses années. Des masses plus importantes en HCB et dieldrine ont été retrouvées au niveau du puits de référence et pourraient s'expliquer par sa situation au sein d'une zone de maraîchage dans laquelle ces pesticides ont pu être utilisés. La distribution en HAP un peu particulière de ce puits de référence pourrait provenir de sa proximité avec le technicentre de la SNCF qui pourrait constituer une source de pollution en HAP. Enfin, une hypothèse aux masses les plus faibles retrouvées pour tous les composés organiques dans le piézomètre le plus en aval serait liée à des mécanismes dits d'atténuation naturelle : l'adsorption sur les phases réactives (matières organiques, argiles, etc.) et la biodégradation, même si celle-ci reste discutable étant donné le caractère récalcitrant de ces familles de contaminants. Enfin, aucun des PBDE recherchés n'a été détecté.

En ce qui concerne l'étude des sédiments de l'étier qui relie le collecteur des eaux pluviales à la Loire, des résultats ont aussi été obtenus. Les teneurs en PCB et en HAP en sortie du collecteur sont supérieures à celles de l'embouchure de l'étier, en aval, plus de 2 et de 5 fois respectivement. Deux hypothèses peuvent être avancées. D'une part, les composés peuvent être adsorbés, dégradés par photolyse, hydrolyse ou activité biologique dès leur sortie du collecteur et jusqu'à l'embouchure. D'autre part, les phénomènes de marées emportent peut-être les sédiments de surface de l'étier, mais de façon plus limitée avec le rapprochement de la sortie du collecteur, menant à l'établissement d'un gradient de contamination. Les valeurs moyennes en HCB et HAP des sédiments de la zone de l'estuaire de la Loire, où se trouve le rejet de l'étier, sont proches de celles de l'embouchure de celui-ci. Par contre, la teneur en HAP reste près de 2 fois plus importante dans les sédiments de l'embouchure de l'étier comparée à celle des sédiments de Loire. Pour finir, aucun PBDE n'a été détecté dans les sédiments.

*Ces travaux ont fait l'objet de
1 poster : P22*

I.2. Étude sur le Pont de Cheviré

Cette étude avait pour abréviation MICROBARET pour « Contamination en microplastiques dans des bassins de rétention d'eaux de ruissellement urbaines ». Il visait tout d'abord à réaliser un état des lieux de la contamination en microplastiques d'un ouvrage de gestion des eaux pluviales urbaines, le bassin de rétention-infiltration collectant les eaux de ruissellement du pont de Cheviré sur la commune de Nantes. En effet, l'intérêt récent des scientifiques vis-à-vis de la problématique des microplastiques fait que de nombreux écosystèmes restent encore non explorés. C'est le cas des ouvrages de gestion des eaux pluviales pour lesquels les données publiées dans la littérature scientifique sont rares. Pourtant, ces ouvrages reçoivent les eaux de ruissellement des réseaux routiers, chargées en macrodéchets et en polluants et pouvant conduire à une concentration en microplastiques élevée. Le premier objectif de cette étude était donc innovant puisque les microplastiques ont été caractérisés et quantifiés pour la première fois dans un bassin de rétention-infiltration. Les compartiments étudiés étaient la colonne d'eau et le sédiment. Par ailleurs, les eaux et sédiments des bassins de rétention peuvent présenter des niveaux de contamination en polluants organiques relativement élevés, notamment en HAP. En effet, ils sont produits par des phénomènes de combustion, ils se retrouvent notamment libérés dans l'environnement par le chauffage urbain ou les moyens de transport. Les microplastiques étant susceptibles de sorber des composés organiques, des mesures d'HAP sur les macrodéchets plastiques récoltés sur le terrain ont été entreprises dans cette étude. En parallèle, la contamination en HAP des eaux et des sédiments du bassin de rétention a également été caractérisée, permettant ainsi d'atteindre le second objectif de cette étude qui était d'appréhender la capacité de sorption des macroplastiques dans un environnement bien particulier qu'est le bassin de rétention-infiltration du pont de Cheviré.

Cette zone d'étude représente une superficie d'environ 800 m² et comporte une surverse vers la Loire qui fonctionne rarement, car il n'y a pas de membrane imperméable dans le fond du bassin, ce qui fait que le bassin est en eau seulement lors de forts épisodes pluvieux. Trois zones ont été définies au niveau du bassin : une zone au niveau de l'émissaire, une zone

intermédiaire et une dernière zone la plus éloignée de l'émissaire. Des prélèvements d'eau, de sédiments superficiels et de macrodéchets plastiques ont été réalisés en triplicats en février 2018 afin d'analyser les microplastiques et les HAP dans ces différents prélèvements.

Toutes les données n'ont pas encore été complètement exploitées. Cependant, quelques conclusions ressortent des premiers résultats obtenus. En ce qui concerne la colonne d'eau, les concentrations en HAP de la phase particulaire sont comprises entre 83,7 et 226,3 ng/L avec des teneurs significativement plus élevées au niveau du rejet des eaux de ruissellement dans le bassin de rétention. La colonne d'eau contient également des microplastiques qui vont de $2,3 \pm 1,0$ à $5,3 \pm 3,5$ microplastiques par litre. Pour ce qui est du sédiment, les teneurs en HAP vont de 734,2 à 1379,2 $\mu\text{g/kg}$ et celle en microplastiques dans la zone la plus éloignée de l'émissaire est de $0,53 \pm 0,24$ microplastiques par kg. Près de 70% de l'ensemble des microplastiques sont faits de PP, qui se trouve être la matière plastique la plus utilisée dans l'industrie automobile (Plasticeurope, 2017). La taille des microplastiques est majoritairement entre 100 et 200 μm dans la colonne d'eau et 50 et 100 μm dans les sédiments. Pour finir, les teneurs en HAP déterminées sur les déchets plastiques trouvés sur le terrain sont dépendantes de la nature du plastique. Les teneurs moyennes en HAP sont $476,6 \pm 316,1$ et $9,9 \pm 11,8$ $\mu\text{g/kg}$ respectivement pour les déchets de PE et de PET. Ce qu'il est intéressant de relever c'est que les teneurs en HAP sont finalement plus faibles dans les déchets plastiques que dans le sédiment. Cela étant, ils n'en sont pas moins de bons adsorbants en HAP, particulièrement ceux constitués de PE, et sont aussi capables de les transporter sur de longues distances. Finalement, il était impossible de quantifier les HAP sorbés sur les microplastiques comme nous souhaitions le faire au départ. Ces derniers sont trop peu nombreux pour représenter une masse suffisante pour l'extraction et permettre de dépasser les limites de détection de l'appareillage analytique. De plus, il faudrait également s'assurer que le protocole permettant leur isolement ne désorbe pas les contaminants de surface.

I.3. Projet à venir

Le partenariat développé dans ces deux projets ouvre des perspectives. Les 3 partenaires, forts de leurs axes de recherche respectifs et de leur complémentarité, souhaitent pérenniser ce partenariat en participant à des appels à projets régionaux ou nationaux (EC2CO INSU - CNRS ou ANR) sur les problématiques de pollution des sols urbains et les transferts vers le littoral et impacts associés. Ce projet pourrait concerner une étude plus approfondie des transferts de contamination le long du continuum continent/estuaire ligérien en y associant d'autres acteurs régionaux sur cette thématique, tels que l'IFREMER, l'IMMM, l'unité Écosystèmes, Biodiversité, Évolution (ECOBIO) de Rennes ou encore le Laboratoire Eau et Environnement des Systèmes Urbains (LEESU) de l'École des Ponts et Chaussées, spécialisée en hydrologie urbaine et qui a entamé des travaux sur les microplastiques dans les eaux de ruissellement.

Cette étude du continuum continent/estuaire ligérien pourrait permettre d'étendre l'évaluation de la contamination en microplastiques à d'autres bassins de rétention de différentes constitutions et réceptionnant par exemple, des eaux de provenances diverses (urbaines, agricoles). Ainsi, les sources et le devenir des microplastiques dans ces écosystèmes pourraient être déterminés plus précisément. L'étude portant sur la capacité de sorption des

plastiques en d'autres familles de polluants organiques (PCB, retardateurs de flamme bromés, AP, etc.) et celle sur les transferts de polluants plastiques et organiques à la Loire constituent d'autres pistes d'exploration. La dimension écotoxicologique pourrait être ajoutée au travail avec la mesure d'effets engendrés par ces contaminants sur des organismes terrestres, qui relève de l'expertise de l'unité ECOBIO, et sur des organismes marins, qui est aussi un volet d'expertise de notre équipe ECEm. Il serait intéressant d'exposer des organismes à des macrodéchets plastiques récoltés dans l'environnement, associés ou non à une contamination en contaminants organiques afin d'évaluer si le déchet plastique constitue une source de contaminants organique qui mène à une imprégnation et des effets sur les organismes ou bien s'il s'agit au contraire d'un puits permettant de limiter l'exposition des organismes.

II. Les éléments terres rares

Lorsque j'ai réalisé mon travail doctoral, j'ai eu l'opportunité de doser les terres rares dans les sols de forêt au sein du LARC du CEA de Cadarache avec lequel était établie une collaboration. Cela fait près de dix ans et à ce moment-là, il n'y avait pas réellement de problématique environnementale les concernant. Ils avaient été ajoutés à la liste des métaux analysés puisque cela ne demandait pas beaucoup de travail additionnel lors de l'analyse en ICP-MS. La recherche de ces éléments dans les sols de forêt était plutôt prospective. À titre indicatif, des effets des feux de forêt avaient été mis en évidence sur les teneurs en terres rares.

Par la suite, l'opportunité de travailler à nouveau sur les terres rares s'est présentée avec l'implication de notre équipe dans un projet financé par l'ANR intitulé EcotREE pour « Ecotoxicology of rare earth elements in aquatic systems ». Ce projet a débuté en 2016 en collaboration avec le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), le Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) et le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Dans ce cadre-là notre travail consiste principalement à réaliser des dosages en terres rares dans des matrices aqueuses et biologiques issues des milieux d'expositions réalisées dans d'autres laboratoires. Finalement, nous avons voulu approfondir ce champ d'investigation et nous avons déposé une demande de financement de thèse à ce sujet qui a été validée par l'école doctorale pour Marjorie Lortholario, qui a débuté son contrat en septembre 2017. Je fais partie de son encadrement et je la suis quotidiennement dans le suivi de son travail. Ainsi, la suite de cette partie va présenter ces contaminants émergents, les premiers résultats obtenus et les perspectives.

II.1. Présentation des terres rares

Les terres rares sont étudiées depuis de nombreuses années, principalement dans des contextes biogéochimiques, nucléaires et médicaux. Le nombre d'articles scientifiques qui les concernent dans les domaines de l'environnement, la biologie, la chimie, la médecine, la toxicologie de Science Direct dépasse plusieurs milliers par an. Étant donné qu'elles sont de plus en plus utilisées dans des objets du quotidien, des problématiques écotoxicologiques émergent. Lorsque le mot clé « ecotoxicology » est ajouté à celui des « rare earth elements » dans le moteur de recherche de Science Direct, beaucoup moins d'articles sont proposés même si une légère tendance à la hausse ces dernières années est observable comme le montre la Figure 35.

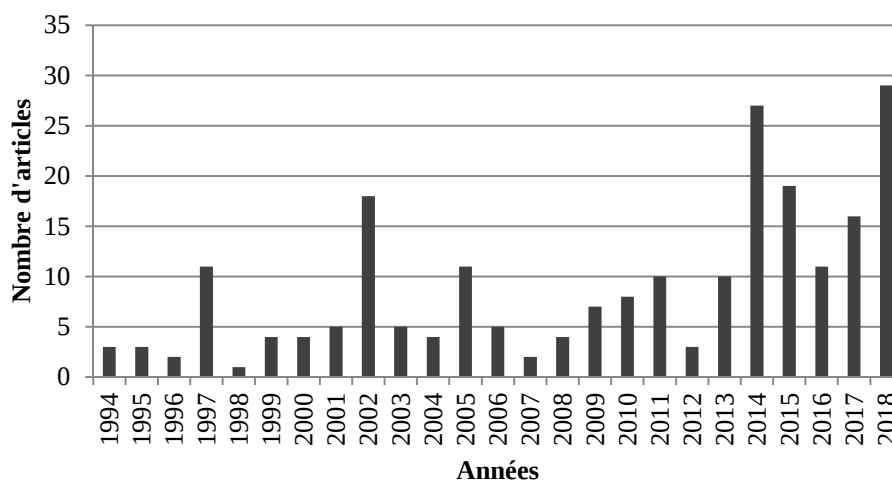


Figure 35 : Nombre d'articles référencés par année dans Science Direct avec [rare earth element ^ environment ^ ecotoxicology] dans le corpus titre/mots clés/résumé (27/01/2019)

Les terres rares sont des éléments non essentiels relativement abondants dans la croûte terrestre appartenant à la 3^e période du tableau de Mendeleïev. Elles sont au nombre de 17 : le scandium, l'yttrium et les 15 lanthanides. Leur distribution est dépendante de la nature des minerais constituant la roche mère (Humphries, 2012 ; Ondrejka et al., 2007 ; Spear and Pyle, 2002) et globalement, l'altération de cette dernière mène à une distribution assez stable des terres rares dans le milieu naturel. Leur configuration électronique leur confère des propriétés communes et particulières qui rendent incontournable leur utilisation sur le plan socio-économique. Elles sont hautement réactives grâce à leur configuration électronique unique (Huang, 2011 ; Koyanagi and Bohme, 2001), réagissent avec la plupart des éléments non métalliques (H, O, S) et forment des complexes avec des ligands inorganiques (carbonates, phosphates) et des ligands organiques (acides fulviques et humiques) (Nockemann et al., 2006 ; Tang and Johannesson, 2003).

Les terres rares entrent dans la composition de nombreux produits de notre quotidien (écrans à cristaux liquides, panneaux solaires, batteries, aimants permanents, céramique, alliages métallurgiques, etc.) et apparaissent aussi comme de possibles substituts à l'énergie pétrolière (éoliennes, véhicules hybrides, éclairages à LED) (Gambogi, 2014 ; Guimarães et al., 2016 ; Ramos et al., 2016 ; Xie et al., 2014 ; Tan et al., 2015). La consommation mondiale en 2014 atteignait 120 000 tonnes et reste en constante augmentation les dernières années. La Chine domine de loin le marché des terres rares avec une production d'environ 98% de la production mondiale (Alonso et al., 2012). À cause de leur importance économique et stratégique, les terres rares sont caractérisées comme des matériaux dont la ressource est critique pour les nombreuses applications technologiques et industrielles (Du and Graedel, 2011 ; Massari and Ruberti, 2013).

Leur utilisation à l'échelle mondiale, stimulée par la multiplication des applications de haute technologie, perturbe les cycles biogéochimiques naturels. Ces perturbations sont très marquées dans des sites miniers d'extraction de terres rares, leurs eaux usées et les déchets (Chakhmouradian and Wall, 2012 ; Haque et al., 2014 ; Humphries, 2012 ; Jordens et al., 2013 ; Navarro and Zhao, 2014 ; Paulick and Machacek, 2017) ainsi que les sols alentours qui contiennent des quantités en terres rares pas moins de 100 fois celle de la croûte terrestre (Sloof,

1995). En dehors de ces sites de production, des terres rares ont été détectées et quantifiées dans les milieux terrestres et aquatiques dans de nombreux pays comme les États-Unis, la Chine, le Royaume-Uni, la France, le Canada, l'Allemagne, etc. (Hatje et al., 2016 ; Klaver et al., 2014 ; Kulaksiz and Bau, 2011a, 2011b ; MacMillan et al., 2017 ; Möller et al., 2014 ; Wei et al., 2013) avec des potentiels enrichissements en La, Gd et Sm mis en évidence dans les cours d'eau. En effet, une fois rejetées dans l'environnement, les terres rares vont pouvoir être mobilisées et transportées sur de longues distances (Cao et al., 2017 ; Möller et al., 2014) en fonction de leur spéciation, de leur nature, et de celle du milieu récepteur. La salinité, les conditions redox, le pH, la matière organique, les agents chélatant sont autant de facteurs pouvant influencer leur distribution dans l'environnement (Guo et al., 2010 ; Marsac et al., 2011 ; Piper and Bau, 2013 ; Wilke et al., 2017). De manière générale, les terres rares présentent certaines propriétés physico-chimiques générales dans l'environnement comme une faible solubilité et une forte affinité avec la matière organique. Ainsi, dans les milieux aquatiques, les terres rares se retrouveront plutôt dans la matrice sédimentaire.

Néanmoins, le corpus de connaissances sur les terres rares, et notamment les données sur leur écotoxicité au sens large reste très fragmentaire (Gwenzi et al., 2018). De ce fait, des études complémentaires sont absolument nécessaires. En particulier, peu d'informations sont disponibles sur les teneurs biodisponibles, les voies et mécanismes de bioaccumulation et leur toxicité sur des organismes vivants dans les milieux aquatiques, et notamment estuariens et marins, réceptacle ultime de nombreux contaminants d'origine anthropique (Gwenzi and Chaukura, 2017).

La relation dose-effet des terres rares a montré une tendance avec 2 phases distinctes : à faibles concentrations des effets bénéfiques sur la croissance des organismes terrestres et aquatiques (Wang et al., 2000) et à hautes concentrations des effets toxiques, observés par exemple sur le rat ou la souris (Pagano et al., 2015). Chez la daphnie, le La a présenté des délais de maturation (*Daphnia carinata* ; Barry and Meehan, 2000) et le Gd de la mortalité (Perrat et al., 2017). Le Gd s'est également avéré toxique sur des organismes marins comme l'oursin ou des bivalves (Martino et al., 2017, 2018; Perrat et al., 2017; Trifuoggi et al., 2017). Des expositions en laboratoire avec de fortes doses en terres rares peuvent mener à une multitude de réponses chez les organismes et aucun mécanisme n'est encore accepté par l'ensemble des écotoxicologues pour interpréter ces effets (Lu et al., 2003). Il a été montré tout de même que la toxicité diminue avec l'augmentation du numéro atomique des lanthanides (Zielhuis, 2006). Dans la plupart des cas, les études sont réalisées avec un seul élément parmi les terres rares (souvent le Ce, le La ou le Gd), ce qui est complètement dissocié de la réalité environnementale, puisque toutes les terres rares y sont retrouvées en mélange (Pagano et al., 2015).

II.2. Étude en cours

II.2.1 Les objectifs

Les objectifs du projet sur les terres rares sont d'apporter des éléments d'information pour l'évaluation des risques environnementaux en documentant les sources, le devenir et le transfert des terres rares dans les différents compartiments d'un écosystème aquatique anthropisé tel qu'un estuaire. Ils se répartissent en trois axes :

1) L'étude des sources potentielles de terres rares sur l'estuaire de Loire. Elle vise à caractériser les activités humaines consommatrices de terres rares présentes sur l'estuaire (d'Ancenis à St Nazaire). Une enquête sur les volumes utilisés et les rejets sera réalisée afin de localiser les secteurs les plus exposés.

2) La caractérisation du contenu en terres rares du milieu estuarien ligérien. L'étude portera sur le compartiment sédimentaire, zone de stockage préférentielle des terres rares. Puis, la colonne d'eau sera étudiée au travers d'une approche intégrative, à l'aide d'échantillonneurs passifs, afin de permettre la détection et la quantification de ces éléments malgré leur faible concentration. Une phase de mise au point sera essentielle et menée en laboratoire au préalable puisque cette technique est encore très peu utilisée pour l'analyse des terres rares. Cette seconde partie du travail permettra de caractériser les niveaux de concentration auxquels sont exposés les organismes aquatiques, et de mettre en évidence d'éventuels enrichissements d'origine anthropique.

3) La bioaccumulation par deux espèces clés de l'écosystème estuarien ligérien : l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et le flet commun (*Platichthys flesus*). Le choix de ces espèces est d'autant plus pertinent qu'elles (i) sont benthiques, donc vivant au contact des sédiments, (ii) présentent de forts enjeux socio-économiques au niveau régional, et (iii) sont consommées par l'homme. Après une étude approfondie de l'organotropisme des terres rares, les variations spatio-temporelles, intra- et inter-spécifiques seront évaluées.

La réalisation de ce travail bénéficiera d'échantillons de sédiments, d'anguilles et de flets récoltés lors de campagnes d'échantillonnage saisonnières réalisées dans le cadre de 2 précédentes thèses sur l'écosystème ligérien (suivi de 2009 à 2012), auxquels seront ajoutés des échantillons récoltés lors de nouvelles campagnes. Ainsi, l'étude des variations temporelles pourra être réalisée sur un long terme.

II.2.2 Les premiers résultats

- *Caractérisation des sources en estuaire de la Loire*

Étant donné que les terres rares ne font pas partie des composés prioritaires à analyser dans l'environnement, aucun suivi n'est réalisé de façon systématique par un organisme dédié. De fait, la caractérisation des sources en terres rares au niveau de l'estuaire de la Loire a été réalisée au travers l'envoi d'un questionnaire à toutes les entreprises ayant des activités susceptibles de rejeter des terres rares dans l'estuaire choisies dans 2 bases de données : l'ICPE (Installations Classées Pour l'Environnement) et l'IREP (Registre des Émissions Polluantes). Sur les 95 enquêtes envoyées, seulement 10 ont été retournées et aucune ne faisait état d'une utilisation ou d'une émission de terres rares dans l'environnement. Pourtant, il semblerait bien que certaines entreprises, faisant partie du tissu industriel local, fassent entrer les terres rares dans leurs procédés industriels.

- *Teneurs en terres rares des compartiments abiotiques*

Même si les terres rares sont potentiellement plutôt retrouvées dans les matrices sédimentaires du milieu aquatique, l'objectif du projet est de déterminer les teneurs à la fois dans les sédiments et la colonne d'eau.

- Sédiments

En tout premier lieu, une méthode a été mise au point et validée pour l'analyse simultanée des 17 éléments ciblés (Sc, Y, et les 15 lanthanides). Cette méthode fait intervenir une étape de minéralisation par micro-ondes et une étape d'analyse par ICP-MS. Après différents essais, la procédure optimale est obtenue avec de l'eau régale. Sa validation faite en utilisant un matériau de référence certifié (CRM 667 : estuarine sediment n°4024) de sédiment montre des rendements corrects, compris entre 90 et 110%, pour les éléments les plus légers : Sc, Y et ceux du La au Tb. Par contre, les rendements diminuent ensuite avec l'augmentation de la masse atomique pour atteindre la plus basse valeur de rendement autour de 55% pour le plus lourd, le Lu.

Quelques échantillons de sédiments collectés en 2012, dans le cadre de la thèse de Mickaël Couderc, ont été étudiés avec la méthode d'analyse faisant intervenir l'eau régale. Ils étaient lyophilisés et tamisés à 2 mm. Les résultats obtenus sont en cours de normalisation à partir d'échantillons standards pour mettre en évidence de potentiels enrichissements ou appauvrissements. Les premières ébauches suggèrent un enrichissement en Sm et Gd sur certains sites de l'estuaire.

- Colonne d'eau

L'évaluation des terres rares dans la colonne d'eau se fera par l'utilisation d'échantillonneurs passifs de type DGT, étant donné que les terres rares sont assez peu solubles dans l'eau et probablement en faibles concentrations. Cette partie a commencé à être appréhendée par l'étude des coefficients de diffusion des éléments au travers le gel diffusif du dispositif, au laboratoire. Étant donné qu'il existe un gradient de salinité dans l'estuaire, il est important d'évaluer la variabilité des coefficients de diffusion en fonction de celle-ci. Les expérimentations se font grâce à la réalisation et l'utilisation de cellules émettrices et réceptrices en verre entre lesquelles est positionné le gel diffusif habituellement utilisé dans les DGT. Le suivi de la concentration en terres rares dans la cellule émettrice permet d'évaluer le transfert des éléments au travers du gel.

- *Teneurs en terres rares des anguilles et des flets*

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et le flet commun (*Platichthys flesus*) sont des espèces que nous avons déjà étudiées lors de 2 précédentes thèses réalisées dans notre équipe de recherche. Les questions à la recherche étaient différentes, puisque le travail portait sur les perturbations endocriniennes, mais ces espèces ont été choisies pour plusieurs raisons. En effet, elles sont sédentaires (excepté à maturation sexuelle pour les anguilles), benthiques et euryhalines. Elles représentent un fort poids socio-économique et sont consommées par l'homme. Par ailleurs, l'anguille est aussi une espèce en déclin, qui présente de fortes teneurs lipidiques et qui se trouve haut dans le réseau trophique estuarien. Pour toutes ces raisons, ces espèces semblent être des espèces modèles de choix.

Tout comme pour les sédiments, la première approche à cette partie de l'étude sur les terres rares a été de mettre au point la méthode d'analyse. Pour cela, un CRM de moules (BCR-668) a été utilisé. Les teneurs en terres rares dans les tissus de moules et de poissons étaient trop faibles pour utiliser la méthode mise au point pour les sédiments. Il a fallu envisager la « concentration » de l'échantillon. Pour ce faire, après consultation de l'état de l'art, une étape de calcination de l'échantillon a été ajoutée après la lyophilisation et le broyage des échantillons, et avant leur minéralisation avec un mélange $\text{HNO}_3\text{:HCl}$ (4,5:0,5 v/v). Les rendements obtenus sont satisfaisants atteignant des valeurs entre 100 et 120% pour tous les éléments, excepté l'Y qui est surestimé et le Sc, l'Ho et le Pm qui n'appartiennent pas à la liste des éléments certifiés dans l'échantillon de référence. Les résultats préliminaires obtenus pour les anguilles de la campagne d'échantillonnage de la thèse de Mickaël Couderc montrent quelques variations spatiales des teneurs en Nd, Dy, Er et Yt chez l'anguille jaune, qui est sédentaire, ainsi que des variations des teneurs en La, Ce et Nd, relatives au genre pour les anguilles argentées. L'étude des branchies et des foies montrent des variations quantitatives et qualitatives en fonction des organes. Les terres rares sont en plus grandes concentrations dans le foie, puis les branchies et enfin les muscles. Chaque organe montre une empreinte en terres rares qui lui est propre et qui est assez peu dépendante des facteurs spatio-temporels pour le foie et les branchies.

II.3. Perspectives à court terme

Afin d'atteindre les objectifs fixés, tous les axes précédents méritent encore d'être approfondis. En ce qui concerne la détermination des sources en terres rares, l'idée est de déployer des DGT en entrée et sortie de stations d'épuration (STEP) et d'en étudier les boues lorsque les méthodes seront au point.

Pour ce qui est de la contamination abiotique de l'estuaire, les sédiments collectés en 2012 seront analysés avec une méthode qui sera mise au point avec une minéralisation à l'acide fluorhydrique pour améliorer les rendements d'extraction des éléments les plus lourds. Ces essais seront réalisés en collaboration avec le laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC) de l'Université de Bordeaux. Une nouvelle campagne d'échantillonnage est en cours. Ainsi, des comparaisons spatio-temporelles des teneurs en terres rares dans les sédiments sont envisagées avec la poursuite de la détermination des enrichissements et appauvrissements. Les résultats seront aussi confrontés à d'autres caractéristiques du sédiment comme la granulométrie et la charge en COT afin de mettre en évidence des facteurs d'influence.

Lorsque les coefficients de diffusion auront été déterminés pour les DGT, ainsi que l'étude sur l'impact de la salinité sur ces derniers, ces échantillonneurs passifs seront déployés le long de l'estuaire afin de déterminer les concentrations en terres rares dans la colonne d'eau. Ces déploiements se feront simultanément à une collecte des échantillons de sédiment et sur une durée de 21 jours.

En plus des anguilles, les flets collectés en 2012 dans le cadre de la thèse de Mickaël Couderc sont en cours d'analyse. Ainsi une étude des variations interspécifiques pourra être réalisée en comparant les résultats à ceux des anguilles. Une campagne d'échantillonnage d'anguilles a débuté en novembre pour les organismes argentés et une autre aura lieu

prochainement pour les organismes jaunes. Ainsi, l'influence du stade de développement sur les teneurs en terres rares pourra être étudiée. Pour ces nouveaux organismes, la dissection sera plus poussée afin d'approfondir l'étude de l'organotropisme en ajoutant l'analyse des gonades, du cerveau, de la rate et du sang à celle des muscles, des branchies et du foie. En plus de rechercher des variations spatio-temporelles des teneurs en terres rares chez les organismes piscicoles, d'autres facteurs, cette fois-ci biotiques, seront mis à l'étude comme la taille, le poids, l'âge ou encore la maturité sexuelle. Pour se faire, la lecture des otolithes (concrétions de l'oreille interne) sera réalisée dans les prochaines semaines pour caractériser l'âge des organismes.

II.4. Projet à venir

Dans la continuité de l'étude sur les terres rares en estuaire de Loire et pour répondre aux besoins en termes d'évaluation du risque environnemental de ces contaminants, une autre étude va être proposée à l'appel à projets « Pari scientifique 2019 » de la Région des Pays de la Loire.

Ce projet visera à atteindre plusieurs objectifs :

1. Établir un premier état des lieux de la contamination en terres rares des zones côtières de la région Pays de la Loire au niveau des eaux et des sédiments.
2. Réaliser l'état des lieux de la contamination en terres rares dans un réseau trophique de l'estuaire de la Loire.
3. Evaluer l'impact des terres rares sur ces mêmes organismes via des expositions en laboratoire à des contaminations de terres rares en mélange et très proches de celles relevées dans le milieu nature.
4. Comparer les espèces de moules et huîtres : la contamination, les effets, la capacité de métabolisation/détoxication.

Les principales originalités du projet par rapport à l'état de l'art sont : (i) la zone d'étude, pour laquelle aucune donnée de teneurs en terres rares dans les matrices abiotiques et biotiques ont été publiées, (ii) l'exposition en laboratoire aux terres rares en mélange représentatif du milieu naturel d'un point de vue qualitatif et quantitatif, qui est souvent faite avec un seul élément et (iii) l'évaluation de l'exposition de l'homme aux terres rares par la consommation de ces espèces.

Ce projet sera réalisé en collaboration avec le laboratoire d'écotoxicologie d'IFREMER Nantes.

III. Développement de la SPIR en écotoxicologie

III.1. La spectroscopie proche infrarouge

III.1.1 Généralités

Dans les années 1940-1950, l'utilisation de la spectrophotométrie dans le moyen infrarouge a débuté pour répondre à une application précise qui était l'identification et l'élucidation structurale de composés organiques (Bureau et al., 2019). Avec les progrès technologiques grandissants, l'augmentation de la puissance de calcul et le développement de logiciel de traitement de données, couplés à une diminution des coûts et à la taille des spectromètres, l'utilisation de la spectrométrie dans le proche infrarouge est apparue tardivement (McLure, 1994) et a été développée et employée pour de nombreuses autres applications bien différentes.

La spectroscopie proche infrarouge (SPIR) associée à des outils chimiométriques est une technique analytique mature (Pasquini, 2018), très actuelle et largement répandue dans de nombreux domaines tels que l'industrie pharmaceutique (Jamrógiewicz, 2012), l'industrie agroalimentaire (Bureau et al., 2019), l'industrie pétrochimique, la médecine, etc. (Blanco and Villarroya, 2002). Dans le domaine pharmaceutique, la SPIR est notamment employée dans le contrôle qualité des matières premières et des produits finis (Rodionova et al., 2019), qui doivent respecter des spécifications (uniformité, homogénéité, teneurs en eau, teneurs en principe actif, etc.) avant de pouvoir être utilisées ou commercialisées. De plus, tout au long du processus de fabrication, des analyses rapides peuvent être faites grâce à la SPIR pour répondre à des problématiques d'assurance-qualité (Jamrógiewicz, 2012). Dans l'agroalimentaire, la SPIR permet par exemple d'évaluer la maturité et la qualité des fruits et légumes (Bureau et al., 2009, 2013 ; Clark, 2016 ; Cozzolino et al., 2011), tracer l'origine des produits (Cozzolino, 2016 ; Giusti et al., 2011 ; Huang et al., 2009) ou encore contrôler la contamination biologique (He and Sun, 2015 ; Huang et al., 2009).

La détermination des différents paramètres dans des produits pharmaceutiques ou agroalimentaires fait intervenir des méthodes de référence souvent longues à mettre en œuvre, nécessitant des réactifs coûteux et polluants et de la main-d'œuvre qualifiée. C'est dans ce contexte que la SPIR trouve sa place, car elle va se substituer aux méthodes de référence en présentant de nombreux avantages (Blanco and Villarroya, 2002). En effet, lorsque les modèles sont bâtis et validés, l'analyse est très rapide, elle ne nécessite pas l'utilisation de réactifs, elle est peu coûteuse et non destructive de l'échantillon. Par ailleurs, plusieurs déterminations de teneurs peuvent être réalisées à partir d'une seule analyse en SPIR. La contrepartie de ces nombreux avantages est la durée et la complexité de la phase de mise au point de la méthode. D'ailleurs elle nécessite de connaître les valeurs de référence pour construire un modèle de prédiction quantitative et le valider, grâce à des outils chimiométriques utilisant l'algorithme de régression partielle des moindres carrés (PLS), accompagnés de divers prétraitements mathématiques des spectres (normalisation, correction, dérivation, etc.) (Blanco and Villarroya, 2002).

III.1.2. La SPIR en environnement

Dans un contexte environnemental, la spectroscopie a été utilisée pour estimer des paramètres physico-chimiques d'échantillons solides : sols, composts, biote, mais aussi d'échantillons liquides et gazeux (Gredilla et al., 2016). Le développement de méthodes est croissant au cours du temps comme le montre la Figure 36 issue de la revue de Gredilla et al. (2016).

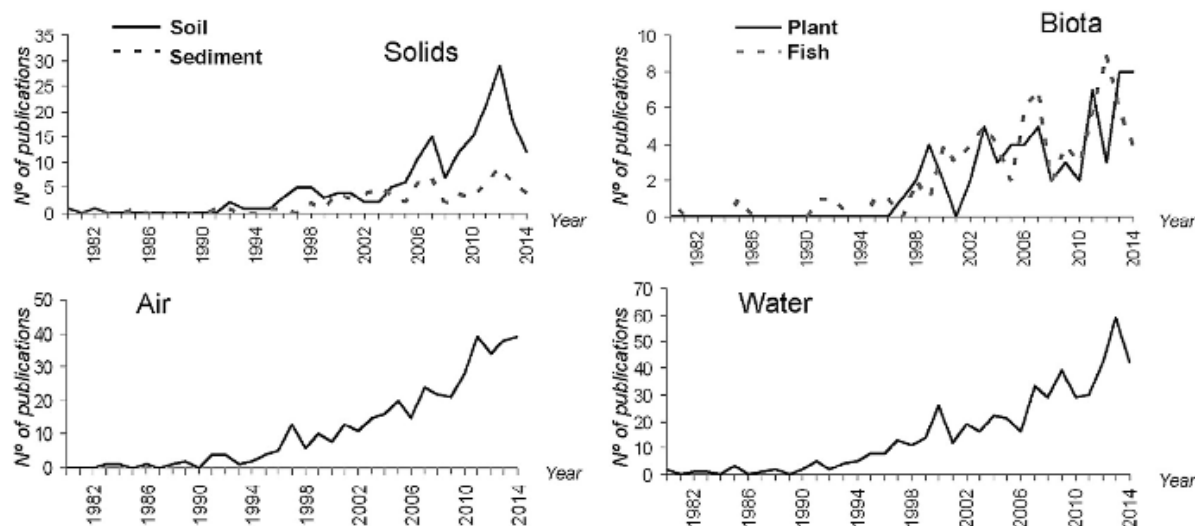


Figure 36 : Nombre d'articles référencés entre 1980 et 2014 sur l'utilisation de la spectroscopie non destructive appliquée à des échantillons environnementaux solides (sols, sédiments, biote), liquides ou gazeux (d'après Gredilla et al., 2016)

De façon plus précise, jusqu'en 2014, la SPIR a été utilisée dans environ 2 articles sur l'eau, 11 sur les plantes, 26 sur les sols et 2 sur les sédiments (Gredilla et al., 2016). Les paramètres étudiés étaient relatifs à la matrice d'étude. Il s'agissait de la détermination des teneurs en hydrocarbures dans les études sur l'eau (Gammoun et al., 2006, 2007). Pour les plantes, les études avaient pour objectif de quantifier le carbone, l'azote, la cellulose, l'eau, les protéines, les tanins par SPIR. (Hein et al., 2010 ; Higa et al., 2013 ; Kleinebecker et al., 2009 ; Kobori et al., 2009 ; Liu et al., 2009 ; Mao et al., 2014 ; Shetty et al., 2012 ; Wu et al., 2012 ; Xin et al., 2012 ; Yan et al., 2011). Pour les sols et les sédiments, de nombreux modèles ont été validés pour quantifier des paramètres variés comme le carbone, l'azote, la matière organique, les teneurs en métaux, des éléments nutritifs, etc. (Gao et al., 2014 ; Hahn et al., 2011 ; Moros et al., 2009 ; Todorova et al., 2014 ; Vohland et al., 2011). Cet objectif était aussi celui de deux publications scientifiques dont je suis l'auteure qui portaient sur le compost (A1) et les sols incendiés (A2). Lors d'une première étude que j'ai réalisée, le processus de maturation du compost a été suivi dans un centre de compostage des boues de STEP. Différents paramètres physico-chimiques (température, humidité, pH, carbone organique, azote organique et inorganique, substances humiques) et biochimiques (fraction soluble, hémicellulose, cellulose, lignine) ont été analysés et modélisés. Cette méthode alternative qu'est la SPIR a permis de s'affranchir des analyses d'origine longues et chères, pour évaluer les paramètres physico-chimiques et biochimiques, et *in fine* la maturité du compost. De bonnes prédictions ont été obtenues pour l'ensemble des paramètres physico-chimiques, mais l'erreur du modèle était trop importante pour prédire l'âge du compost. En ce qui concernait les paramètres biochimiques,

cette étude était plutôt préliminaire en montrant l'intérêt de l'approche, mais aussi la nécessité d'approfondissements. Lors de mes travaux de thèse, j'ai utilisé à nouveau cette méthodologie dans le but de prédire les propriétés physico-chimiques des sols de forêt impactés par des incendies. Des mesures de carbone et d'azote organique total, des substances humiques, des teneurs en NH_4^+ , phosphore, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ ont été prises. L'étude a montré que la SPIR peut être considérée comme un bon outil de suivi des paramètres physico-chimiques des sols à l'exception des teneurs en K^+ . Cette méthode semblait donc utile pour cartographier l'état des sols de forêt plus ou moins affectés par les feux en permettant d'envisager des réhabilitations futures adéquates.

D'autres publications, non mentionnées dans la revue d'articles de Gredilla et al (2016) traitent de l'utilisation de la SPIR pour étudier des organismes aquatiques. Étant donné que le but de ces études était plutôt d'évaluer la qualité et limiter les risques sanitaires des produits consommés par l'homme, ces travaux n'ont pas été utilisés dans la revue d'articles de Gredilla et al. (2016). C'est en 2014 qu'était parue une autre revue d'articles traitant du sujet (Cheng et Sun, 2014). Ainsi, la SPIR a été utilisée sur les poissons pour prédire les lipides et l'humidité du bar européen (Ottavian et al., 2012) et du saumon (Folkestad et al., 2008) ainsi que la fraîcheur de l'espadon (Bøknæs et al., 2002) et du cabillaud (Fasolato et al., 2012). Pour ce qui est des bivalves, des études ont porté sur l'huître (Brown, 2011 ; Madigan et al., 2013) pour quantifier la composition biochimique en protéines, lipides et glucides. Plus récemment, une autre étude s'est intéressée à cinq espèces de bivalves, dont l'huître et la moule, afin de quantifier les lipides, les glucides et les protéines avec deux buts annoncés en préambule, la qualité des produits comestibles et la surveillance environnementale (Bartlett et al., 2018a). Puis, cette même équipe de chercheurs a réalisé une seconde étude sur les mêmes espèces dans un but bien plus environnemental, puisqu'elle a porté sur l'évaluation de l'allocation énergétique cellulaire (Bartlett et al., 2018b). En effet, l'allocation énergétique cellulaire est la différence entre la disponibilité et la consommation d'énergie des organismes et correspond à un biomarqueur d'évaluation d'état de santé, de développement et de reproduction des espèces.

2 articles : A1, A2

1 communication orale : CO6

2 posters : P5, P8

III.2. Projet à venir

Les axes de recherche de l'équipe ECEm ont pour objet l'étude des milieux côtiers et estuariens et notamment les sédiments et les organismes marins. Les milieux côtiers et estuariens sont soumis à des pressions de contaminations anthropiques fortes. Par conséquent, la qualité des milieux et la santé des organismes doivent être évaluées. La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) imposent aux états membres de l'Union Européenne d'atteindre ou de maintenir un bon état écologique du milieu marin à l'horizon 2020. L'atteinte et le maintien de ce bon état écologique nécessite au préalable une évaluation de la qualité des milieux. Souvent, des méthodes longues et coûteuses sont réalisées pour atteindre cet objectif.

Dans ce contexte, le but du projet que je propose ici serait de développer des méthodes d'évaluation d'une part, de la qualité sédimentaire et d'autre part, de la qualité de l'eau associée à l'état de santé des organismes marins, en utilisant une méthode d'analyse simple et peu coûteuse : la SPIR.

Les sédiments sont le réceptacle ultime de nombreux contaminants, ce qui en fait un objet d'étude privilégié. À ma connaissance, seulement deux études sur l'analyse de paramètres sédimentaires ont été publiées (Hahn et al., 2011 ; Moros et al., 2009). Ainsi, des teneurs en métaux, carbone, silice et azote total ont pu être prédites grâce à la SPIR. L'approfondissement de ces études semble judicieux en ajoutant éventuellement d'autres paramètres à prédire comme la matière organique, l'azote organique, les éléments nutritifs, etc. Il serait intéressant d'essayer de prédire des contaminants environnementaux. Cela étant, leurs concentrations sont souvent faibles, trop faibles pour dépasser les limites de détection élevées en SPIR, qui représente un des principaux inconvénients de la méthode (Cozzolino, 2016). Les autres inconvénients se trouvent au niveau de la préparation d'échantillon (séchage, broyage, homogénéisation), des tailles de particules, des effets de matrice et du nombre d'échantillons qui doit être important (Cozzolino, 2016). Si les teneurs en contaminants ne peuvent être prédites, un indice de pression anthropique pourrait être développé en fonction des paramètres physico-chimiques des sédiments et de leur contamination en métaux et en composés organiques. Cet indice pourrait alors potentiellement être prédit par SPIR. Ainsi, une évaluation rapide de la qualité sédimentaire pourrait être effectuée et mènerait à l'établissement d'une cartographie des pressions anthropiques sur les milieux aquatiques. De plus, il serait un bon outil d'aide à la décision grâce aux faibles coûts engendrés et à sa rapidité d'obtention des résultats. Si le développement peut être réalisé et la méthode validée sans préparation d'échantillon, l'utilisation d'appareillages portatifs pourrait même permettre l'évaluation directe sur le terrain.

Pour ce qui est des matrices biologiques, l'organisme marin modèle choisi pour mener à bien ce projet est la moule bleue (*Mytilus edulis*), sur laquelle notre équipe de recherche possède à présent de l'antériorité. En effet, les moules sont souvent considérées comme de bons bioindicateurs car ce sont des organismes filtreurs, sessiles, ayant une durée de vie relativement longue et qu'elles sont tolérantes aux stress environnementaux (Anacleto et al., 2015). De plus, elles représentent un fort poids socio-économique au niveau régional, mais aussi national. Les moules sont utilisées pour déterminer les niveaux de contamination des milieux puisque ce sont de bons bioaccumulateurs (Farrington et al., 1995) en contaminants chimiques (organiques et inorganiques), mais aussi physiques (microplastiques). Par ailleurs dans un but d'évaluation des risques environnementaux, la moule est également utilisée pour réaliser des expérimentations en laboratoire pour évaluer, par exemple, des relations doses de contaminants /effets sur les organismes. L'objectif du second volet de ce projet est donc de mettre au point des méthodes de SPIR pour évaluer la qualité de l'eau des milieux, à travers l'utilisation des moules, qui seront considérées comme des échantillonneurs intégrateurs. Pour approfondir ce qui a déjà été réalisé dans de précédentes études, sur l'évaluation de certains paramètres biochimiques (détermination des teneurs en protéines, lipides, glycogène et allocation énergétique cellulaire ; Bartlett et al., 2018a, 2018b), des modèles de prédiction impliquant d'autres biomarqueurs, dont l'analyse et l'interprétation sont maîtrisées au laboratoire, seront développés. Ces biomarqueurs reposent actuellement sur des analyses biochimiques, au niveau individuel ou d'un organe, comme la glande digestive, et permettent d'apprécier les mécanismes de défense et/ou de

dommage au sein des organismes, en réponse à une exposition à des contaminants chimiques et/ou physiques. Ces biomarqueurs font intervenir différentes enzymes (Glutathion S Transferase (GST), détoxification ; Superoxyde dismutase et catalase (SOD, CAT), défense oxydative ; Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), oxydation ; acétylcholinestérase (AChE), neurotoxicité). Chacun de ces biomarqueurs implique l'utilisation d'une méthode de préparation d'échantillon et d'analyse différente. L'intérêt de la SPIR serait d'apporter des informations sur tous ces critères d'état de santé des organismes grâce à une seule et unique analyse. Un travail pour essayer d'établir une corrélation entre l'état de santé des organismes et la qualité de l'eau est ensuite envisagé pour permettre d'extrapoler les résultats obtenus sur la moule, à l'eau du milieu. Comme pour les contaminants chimiques dans les sédiments, les biomarqueurs évoqués seront peut-être difficilement prédictibles par SPIR à cause des limites de détection de la méthode. Pour contourner cela et atteindre le but fixé, un indice d'état de santé des organismes pourra être développé à partir des valeurs des biomarqueurs et la SPIR permettra potentiellement de prédire cet indice.

Un appareillage spectrophotométrique proche infrarouge muni d'une sphère d'intégration est nécessaire à ce projet, comme celui utilisé par Bartlett et al. (2018a, 2018b), et que j'ai également utilisé lors de mon stage de M2 et mon travail doctoral. En ce qui concerne le sédiment, des analyses spectrophotométriques sur échantillons frais, mais aussi secs, ainsi que broyés ou non, seront testés. Des analyses *in situ* sont également envisagées. Pour la matrice biologique, des analyses seront réalisées directement sur l'individu entier décoquillé, voire séché et/ou broyé, ou encore sur la coquille. L'intérêt de travailler sur des individus entiers non préparés repose sur la rapidité d'analyse, en limitant les étapes de préparation d'échantillon.

Dans un second temps, il serait pertinent de pouvoir investiguer la qualité des prédictions sur la matrice biologique à l'échelle de l'organe, notamment la glande digestive. Aucun article ne traite de cela dans l'état de l'art à ma connaissance. Afin de pouvoir enregistrer des spectres proche infrarouge sur les organes, la microscopie couplée à la spectroscopie proche infrarouge serait l'appareillage *ad hoc*. Même si une dissection des échantillons sera indispensable dans ce cas, cet appareil ouvre un champ d'investigations supplémentaires, en permettant d'étudier les organismes à une échelle infra-individuelle.

Conclusion

Ce manuscrit présenté en trois parties principales présente mon profil, la synthèse de mes travaux de recherche et les projets en cours et à venir, en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR). Durant les 13 années de recherche passées, les principales activités que j'ai menées jusqu'ici concernent le domaine de la chimie environnementale associé à des problématiques écotoxicologiques, et s'inscrivent globalement dans un objectif d'évaluation des risques environnementaux. Les contaminants que j'ai eu l'occasion d'étudier sont divers et représentent des composés organiques hydrophobes, des métaux sous forme nanoparticulaire ou dissoute, ou encore des microplastiques. Ces études se positionnent au niveau de la détermination de l'exposition et de l'imprégnation des espèces dans un schéma global relatif à l'écotoxicologie comme le montre le rectangle bleu sur la figure 37.

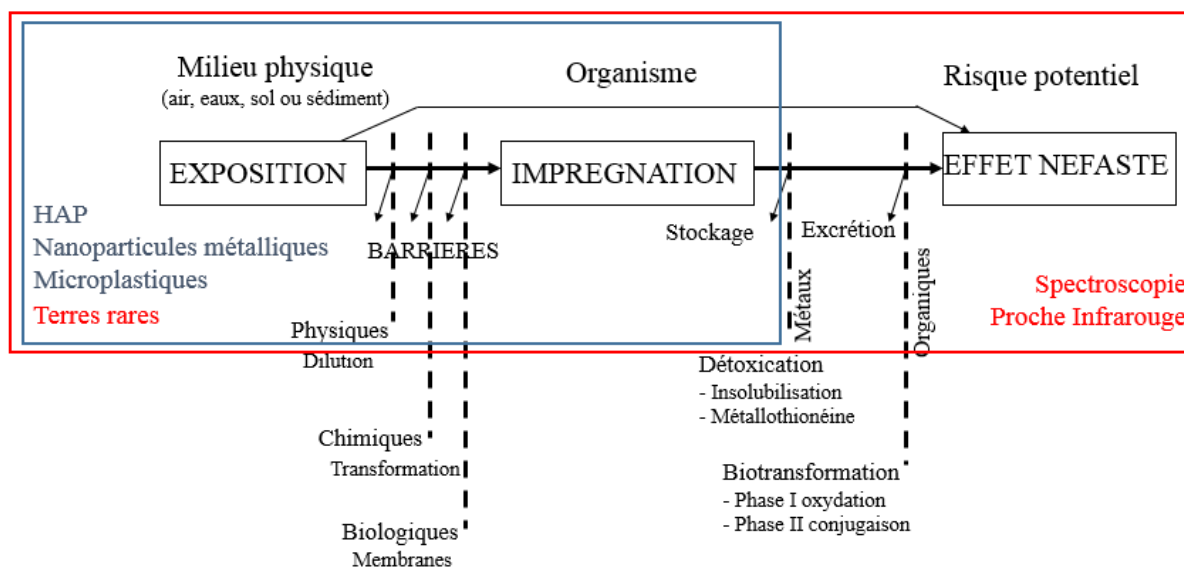


Figure 37 : L'écotoxicologie et le positionnement de mes activités de recherche passées et en cours en bleu et à venir en rouge

Les écosystèmes auxquels je me suis intéressée jusqu'ici sont continentaux, avec la forêt du Massif des Maures, mais également estuariens, notamment celui de la Loire, et également côtiers au niveau de la région des Pays de la Loire. Les compartiments étudiés étaient abiotiques avec à la fois des mesures sur les sols, sédiments, et eaux, faisant intervenir des mesures directes ou indirectes, par le biais d'échantillonneurs passifs. Enfin, pour ce qui est du compartiment biotique, des végétaux ont été analysés, ainsi que des espèces animales ayant divers intérêts au niveau écosystémique, écotoxicologique, biologique, sanitaire, et/ou socio-économique avec un vers de vase : *Hediste diversicolor*, trois bivalves : *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, *Scrobicularia plana* et enfin deux espèces piscicoles : *Anguilla anguilla*, *Platichthys flesus*.

La diversité des écosystèmes, des compartiments et des espèces vivantes a mené à la mise au point, la validation et/ou l'utilisation de nombreuses méthodes analytiques. Afin de répondre aux différentes problématiques sur lesquelles j'ai pu travailler, des stratégies d'échantillonnage ont dû être élaborées, des préparations d'échantillons testées et des méthodes analytiques adaptées. Cette diversité peut être considérée comme le point fort de mon dossier avec l'opportunité de travailler sur de nombreux sujets tout aussi intéressants les uns que les autres, en permettant de développer des facultés d'adaptabilité. Mais elle peut aussi être vue comme un frein avec parfois une discontinuité des nombreux sujets et un manque d'approfondissement.

En plus d'une faculté d'adaptation, mes activités de recherche m'ont permis d'acquérir une expérience sur :

- le volet analytique (échantillonnage, préparation de l'échantillon, analyse, adaptés à différents types de matrices),
- la formation par la recherche avec l'encadrement de 7 stagiaires de M1, 6 de M2 et 4 doctorants,
- le montage et le management de projet, en étant porteuse et/ou coordinatrice MMS de certains,
- la diffusion des connaissances, en publiant et relisant des articles scientifiques, en participant à des congrès nationaux et internationaux et en enseignant auprès des étudiants de la faculté de pharmacie et de master.

Les projets à venir s'inscrivent dans la continuité de ce que j'ai réalisé dans mon parcours professionnel avec toujours un intérêt pour de nouveaux objets de recherche comme le montre le cadre rouge de la Figure 37. En effet, une étude sur des contaminants encore non étudiés au laboratoire : les terres rares, a été entamée. Le continuum terre-mer est également une problématique que je souhaiterais approfondir pour mieux caractériser les flux provenant du milieu continental qui impactent les milieux estuariens et côtiers. Pour finir, je souhaiterais vivement me diriger vers le volet de l'évaluation des effets sur les organismes en écotoxicologie sur lequel j'ai encore peu travaillé. L'idée serait de développer des méthodes de spectroscopie proche infrarouge et mettre au point un outil d'évaluation de la santé des organismes tels que les moules issues soit du milieu naturel, soit d'expositions en laboratoire.

Références bibliographiques

- Alonso E, Sherman AM, Wallington T., Everson MP, Field FR, Roth R, Kirchain RE, 2012. Evaluating rare earth element availability: A case with revolutionary demand from clean technologies. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3406 –3414.
- Anacleto P, Maulvault AL, Nunes ML, Carvalho ML, Rosa R, Marques A, 2015. Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs, *Food Control* 47, 493 –501.
- Andrady AL, 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596-1605.
- Andrady AL, Neal MA, 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 364, 1977-1984.
- Ariesse F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW, 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.* 26 273–86.
- Arthur C, Baker J, Bamford H, 2009. In: *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris*. NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30.NOAA, p. 530. Silver Spring, September 9e11, 2008.
- Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D, 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212, 149-172.
- Barry MJ and Meehan BJ, 2000. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. *Chemosphere* 41, 1669 –1674.
- Bartlett JK, Maher WA, Purss MBJ, 2018a. Near infra-red spectroscopy quantitative modelling of bivalve protein, lipid and glycogen composition using single-species versus multi-species calibration and validation sets. *Spectrochim. Acta A* 193, 537-557.
- Bartlett JK, Maher WA, Purss MBJ, 2018b. Cellular energy allocation analysis of multiple marine bivalves using near infrared spectroscopy. *Ecol. Indicators* 90, 247-256.
- Bertrand C, 2016. Thèse de doctorat. Nanomatériaux à travers un gradient de salinité : exposition et effets écotoxicologiques au cours de leur cycle de vie.
- Beyer J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariesse F, 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 224–244.

Blanco M and Villarroya I.N.I.R, 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. Trends Anal. Chem. 21, 240-250.

Brown MR, 2011. Rapid compositional analysis of oysters using visible-near infrared reflectance spectroscopy. Aquaculture 317, 233-239.

Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P, 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. Mar. Chem., 4th International Symposium on the Biogeochemistry of Model Estuaries 58, pp. 85 –97.

Bureau S, Ruiz D, Reich M, Gouble B, Bertrand D, Audergon JM, Renard C, 2009. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. Food Chem. 115, 1133–1140.

Bureau S, Quilot-Turion B, Signoret V, Renaud C, Maucourt M, Bancel D, Renard CMGC, 2013. Determination of the composition in sugars and organic acids in peach using mid infrared spectroscopy: comparison of prediction results according to data sets and different reference methods. Anal. Chem. 85, 11312-11318.

Bureau S, Cozzolino D, Clark CJ, 2019. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. Postharvest Biol. Technol. 148, 1-14.

Bøknæs N, Jensen KN, Andersen CM, Martens H, 2002. Freshness assessment of thawed and chilled cod fillets packed in modified atmosphere using near-infrared spectroscopy. LWT-Food Science and Technology, 35, 628-634.

Cao S, Duan X, Ma Y, Zhao X, Qin Y, Liu Y, Li S, Zheng B, Wei F, 2017. Health benefit from decreasing exposure to heavy metals and metalloids after strict pollution control measures near a typical river basin area in China. Chemosphere 184, 866 –878.

Chakmouradian AR and Wall F, 2012. Rare earth elements: minerals, mines, magnets and more. Elements 8:333 –340.

Cheng JH and Sun DW, 2014. Hyperspectral imaging as an effective tool for quality analysis and control of fish and other seafoods: Current research and potential applications. Food Sci. Technol. 37, 78-91.

Clausen I and Riisgard HU, 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141, 37-45.

Collier TK and Varanasi U, 1991. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 462-73.

Couderc M, 2014. Thèse de doctorat. Évaluation de la contamination des sédiments et de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de la Loire par des substances chimiques de type perturbateurs thyroïdiens et interprétation en termes d'écotoxicité et de risque sanitaire.

Costa MF, Ivar do Sul JA, Silva-Cavalcanti JS, Araujo MCB, Spengler A, Tourinho PS, 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environ. Monit. Assess. 168, 299-304.

Cozzolino D, 2016. Near infrared spectroscopy as a tool to monitor contaminants in soil, sediments and water—State of the art, advantages and pitfalls. Trends Environ. Anal. Chem. 9, 1-7.

Cozzolino D, Cynkar WU, Shah N, Smith P, 2011. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: potential application to juice and fruit quality Food Res. Int., 44 1888-1896.

Desforges JPW, Galbraith M, Ross PS, 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast Pacific ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320-330.

Della Torre C, Corsi I, Nardi F, Perra G, Tomasino M P, Focardi S, 2010. Transcriptional and post - transcriptional response of drug - metabolizing enzymes to PAHs contamination in red mullet (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758): A field study. Mar. Environ. Res. 70, 95-101.

De Witte B, Devriese L, Bekaert K, Hoffman S, Vandermeersch G, Cooreman K, Robbens J, 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. Mar. Pollut. Bull., 85, 146–155.

Du X and Graedel TE, 2011. Uncovering the global life cycles of the rare earth elements. Sci. Rep. 1, 145.

Enders K, Lenz R, Stedmon CA, Nielsen TG, 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Mar. Pollut. Bull. 100, 70-81.

Engler RE, 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302-12315.

Farrington JW, Tripp BW, States U, 1995. International mussel watch project: initial implementation phase, final report. U.S. dept. of commerce, national oceanic and atmospheric

administration, national ocean service, office of ocean resources conservation and assessment, Silver Spring, Md (22 p).

Fasolato L, Balzan S, Riovanto R, Berzaghi P, Mirisola M, Ferlito JC, Serva L, Benozzo F, Passara R, Tepedino V, Novelli E, 2012. Comparison of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to authenticate fresh and frozen-thawed Swordfish (*Xiphias gladius* L). Journal of Aquatic Food Product Technology, 21, 493-507.

Folkestad A, Wold JP, Rørvik KA, Tschudi J, Haugholt KH, Kolstad K, Mørkøre T, 2008. Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 280, 129-135.

Gambogi J, 2014. Rare Earths. Mining engineering. Minerals Year Book. US Geological Survey.

Gammoun A, Moros J, Tahiri S, Garrigues S, de la Guardia M, 2006. Partial least-squares near-infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by using tanned solid wastes. Anal. Bioanal. Chem. 385, 766–770.

Gammoun A, Tahiri S, Albizane A, Azzi M, Moros J, Garrigues S, de la Guardia M, 2007 Separation of motor oils, oily wastes and hydrocarbons from contaminated water by sorption on chrome shavings, J. Hazard. Mater. 145, 148–153.

Gao Y, Cui L, Lei B, Zhai Y, Shi T, Wang J, Chen Y, He H, Wu G, 2014. Estimating soil organic carbon content with visible-near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy, Appl. Spectrosc. 68, 712–722.

Giusti MM, Atnip A, Sweeney C, Rodriguez-Saona LE, 2011. Rapid authentication of fruit juices by infrared spectroscopic techniques. Progress in Authentication of Food and Wine, American Chemical Society 275-299.

Gorbi S, Baldini C, Regoli F, 2005. Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European Eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). Arch. Environ. Contam.Toxicol.;49, 62–70.

Gredilla A, Fdez-Ortiz de Vallejuelo S, Elejoste N, de Diego A, Madariaga JM, 2016. Non-destructive Spectroscopy combined with chemometrics as a tool for Green Chemical Analysis of environmental samples: A review. Trends Anal. Chem. 76, 30-39.

Guimarães D, Praamsma ML, Parsons PJ, 2016. Evaluation of a new optic-enabled portable X-ray fluorescence spectrometry instrument for measuring toxic metals/metalloids in consumer goods and cultural products. Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 122, 192 –202.

Guo H, Zhang B, Wang G, Shen Z, 2010. Geochemical controls on arsenic and rare earth elements approximately along a groundwater flow path in the shallow aquifer of the Hetao Basin, Inner Mongolia. *Chem. Geol.* 270, 117–125.

Gwenzi W and Chaukura N, 2017. Organic contaminants in African aquatic systems: current knowledge, health risks, and future research directions. *Sci. Total Environ.* 619, 1493–1514.

Gwenzi W, Mangori L, Danha C, Chaukura N, Dunjana N, Sanganyado E, 2018. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high- technology rare earth elements as emerging contaminants. *Sci. Total. Environ.* 636, 299-313.

Hahn A, Rosen P, Kliem P, Ohlendorf C, Zolitschka B, 2011. Comparative study of infrared techniques for fast biogeochemical sediment analyses, *Geochem. Geophys. Geosyst.* 12, 1–8.

Haque N, Hughes A, Lim S, Vernon C, 2014. Rare earth elements: overview of mining, mineralogy, uses, sustainability and environmental impact. *Resources* 34:614–635.

Harvey RG, 1991. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, USA 1991.

Hatje V, Bruland KW, Flegal AR, 2016. Increases in anthropogenic gadolinium anomalies and rare earth element concentrations in San Francisco Bay over a 20 year record. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4159-4168.

He HJ and Sun DW, 2015. Microbial evaluation of raw and processed food products by visible/infrared, Raman and fluorescence spectroscopy. *Trends Food Sci. Technol.*, 46 199-210.

Hein PRG, Clair B, Brancheriau L, Chaix G, 2010. Predicting microfibril angle in Eucalyptus wood from different wood faces and surface qualities using near infrared spectra. *J. Near Infrared Spectrosc.* 18, 455–464.

Higa S, Kobori H, Tsuchikawa S, 2013. Mapping of leaf water content using near-infrared hyperspectral imaging. *Appl. Spectrosc.* 67, 1302–1307.

Huang CH, 2011. *Rare earth coordination chemistry: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.

Huang Y, Rasco BA, Cavinato AG, 2009. *Fruit juices. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 355-375.

Humphries M, 2012. *Rare Earth Elements: The Global Supply Chain*. 2011. Congressional Research Service, 7 –5700.

- Jamrógiewicz M, 2012. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 66, 1-10.
- Jordens A, Cheng YP, Waters KE, 2013. A review of the beneficiation of rare earth element bearing minerals. Miner. Eng. 41, 97 –114.
- Kanzari F, Syakti AD, Asia L, Malleret L, Piram A, Mille G, Doumenq P, 2014. Distributions and sources of persistent organic pollutants (aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and pesticides) in surface sediments of an industrialized urban river (Huveaune), France. Sci. Total Environ. 478, 141 –151.
- Klaver G, Verheul M, Bakker I, Petelet-Giraud E, Négrel P, 2014. Anthropogenic rare earth element in rivers: gadolinium and lanthanum. Partitioning between the dissolved and particulate phases in the Rhine River and spatial propagation through the Rhine-Meuse Delta the Netherlands. Appl. Geochem. 47, 186 –197.
- Kleinebecker T, Schmidt SR, Fritz C, Smolders AJP, Hoelzel N, 2009. Prediction of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in plant tissues with near-infrared reflectance spectroscopy. New Phytol. 184, 732–739.
- Kobori H and Tsuchikawa S, 2009. Prediction of water content in *Ligustrum japonicum* leaf using near infrared chemometric imaging. J. Near Infrared Spectrosc. 17, 151–157.
- Koyanagi GK and Bohme DK, 2001. Oxidation reactions of lanthanide cations with N_2O and O_2 : Periodicities in reactivity. J. Phys. Chem. A 105, 8964 –8968.
- Kulaksız S and Bau M, 2011a. Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities. Appl. Geochem. 26, 1877–1885.
- Kulaksız S and Bau M, 2011b. Rare earth elements in the Rhine River, Germany: first case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. Environ. Int. 37, 973 –979.
- Liu F, He Y, Sun G, 2009. Determination of protein content of *auricularia auricular* using near infrared spectroscopy combined with linear and nonlinear calibrations. J. Agric. Food Chem. 57, 4520–4527.
- Liu Y, Pu H, Sun DW, 2017. Hyperspectral, imaging technique for evaluating food quality and safety during various processes: A review of recent applications. Trends Food Sci. Technol. 69, 25-35.
- Lu ZW, Chen D, Liu Y, Nie YX, Chen HT, Li WG, Ni JZ, 2003. The hormesis effect of rare earth elements on several enzymes in rat liver. Chin. J. Appl. Chem. 20, 6–9.

- MacMillan GA, Chételat J, Heath JP, Mickpegak R, Amyot M, 2017. Rare earth elements in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 19, 1336–1345.
- Madigan T, Kiermeier A, Carragher J, de Barros Lopes M, Cozzolino D, 2013. The use of rapid instrumental methods to assess freshness of half shell Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A feasibility study. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 204-209.
- Mathalon A and Hill P, 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 69–79.
- Mao Z, Shan R, Wang J, Cai W, Shao X, 2014. Optimizing the models for rapid determination of chlorogenic acid, scopoletin and rutin in plant samples by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochim. Acta A* 128, 711–715.
- Marsac R, Davranche M, Gruau G, Bouhnik-Le Coz M, Dia A, 2011. An improved description of the interactions between rare earth elements and humic acids by modeling: PHREEQC-Model VI coupling. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 5625–5637.
- Martino C, Chiarelli R, Bosco L, Roccheri MC, 2017. Induction of skeletal abnormalities and autophagy in *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos exposed to gadolinium. *Mar. Environ. Res.* 130, 12–20.
- Martino C, Costa C, Roccheri MC, Koop D, Scudiero R, Byrne M, 2018. Gadolinium perturbs expression of skeletogenic genes, calcium uptake and larval development in phylogenetically distant sea urchin species. *Aquat. Toxicol.* 194, 57–66.
- Massari S and Ruberti M, 2013. Rare earth elements as critical raw materials: focus on international markets and future strategies. *Res. Policy* 381, 36–43.
- McClure WF, 1994. Near-infrared spectroscopy. The giant is running strong. *Anal. Chem.* 66, 43-53.
- Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J, 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278–1284.
- Möller P, Knappe A, Dulski P, 2014. Seasonal variations of rare earths and yttrium distribution in the lowland Havel River, Germany, by agricultural fertilization and effluents of sewage treatment plants. *Appl. Geochem.* 41, 62–72.
- Moros J, Fdez-Ortiz de Vallejuelo S, Gredilla A, de Diego A, Madariaga JM, Garrigues S, et al., 2009. Use of reflectance infrared spectroscopy for monitoring the metal content of the estuarine sediments of the Nerbioi-Ibaizabal River (Metropolitan Bilbao, Bay of Biscay, Basque Country), *Environ. Sci. Technol.* 43, 9314–9320.

Nagel F, Kammann U, Wagner C, Hanel R, 2002 Metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bile as biomarkers of pollution in European eel (*Anguilla anguilla*) from German Rivers. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2012 62, 254–63.

Navarro J and Zhao F, 2014. Life-cycle assessment of the production of rare-earth elements for energy applications: a review. Front. Energy Res. 2, 45.

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N, 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311, 622-627.

Nisbet C and LaGoy P, 1992. Establishing generic remediation goals for the polycyclic aromatic hydrocarbons: critical issues. Regul. Toxicol. Pharmacol. 16, 290–300.

Nockemann P, Thijs B, Postelmans N, Van Hecke K, Van Meervelt L, Binnemans K, 2006. Anionic rare-earth thiocyanate complexes as building blocks for low-melting metal-containing ionic liquids. J. Am. Chem. Soc. 128, 13658 –13659.

Ogata Y, Takada H, Mizukawa K, Hirai H, Iwasa S, Endo S, et al., 2009. International Pellet Watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Mar. Poll. Bull. 58, 1437-1446.

Ondrejka M, Uher P, Pršek J, Ozdín D, 2007. Arsenian monazite-Ce and xenotime-Y, REE arsenates and carbonates from the Tisovec-Rejkovo rhyolite, western Carpathians, Slovakia: composition and substitutions in the REE, Y XO₄ system X = P, As, Si, Nb, S. Lithos 951, 116–129.

Ottavian M, Facco P, Fasolato L, Novelli E, Mirisola M, Perini M, Barolo M, 2012. Use of near-infrared spectroscopy for fast fraud detection in seafood: application to the authentication of wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Agric. Food Chem., 60, 639-648.

Pagano G, Guida M, Tommasi F, Oral R, 2015. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements - knowledge gaps and research prospects. Ecotoxicol. Environ. Saf. 115, 40 – 48.

Pasquini C, 2018. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. Anal. Chim. Acta 1026, 8-36.

Paulick H and Machacek E, 2017. The global rare earth element exploration boom: an analysis of resources outside of China and discussion of development perspectives. Res. Policy 52, 134–153.

Perrat E, Parant M, Py JS, Rosin C, Cossu-Leguille C, 2017. Bioaccumulation of gadolinium in freshwater bivalves. Environ. Sci. Pollut. Res. 2413, 12405 –12415.

Phuong NN, 2018. Thèse de doctorat. Développements analytiques pour la caractérisation et la quantification de la contamination en microplastiques de matrices sédimentaires et biologiques : application aux zones conchylicoles des Pays de la Loire.

Piper DZ and Bau M, 2013. Normalized rare earth elements in water, sediments, and wine: identifying sources and environmental redox conditions. *Am. J. Anal. Chem.* 4, 69-83.

PlasticsEurope, 2017. Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Protocol on Persistent Organic Pollutants (1999). The 1998 Aarhus protocol to the 1979 convention on long-range transboundary air pollution on persistent organic pollutants (POPs). *ReV. Eur. Community International Environmental Law*, 8, 224 –230.

Ramos SJ, Dinali GS, Oliveira C, Martins GC, Moreira CG, Siqueira JO, Guilherme LRG, 2016. Rare earth elements in the soil environment. *Curr. Pollut. Rep.* 21, 28 –50.

Rios LM, Moore C, Jones PR, 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar. Pollut. Bull.*, 54, 1230-1237.

Rodionova OY, Titova AV, Demkin NA, Balyklova KS, Pomerantsev AL, 2019. Qualitative and quantitative analysis of counterfeit fluconazole capsules: A non-invasive approach using NIR spectroscopy and chemometrics. *Talanta* 195, 662-667.

Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD, 2003. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Sci. Total Environ.* 301,105–17.

Shetty N, Rinnan A, Gislum R, 2012. Selection of representative calibration sample sets for near-infrared reflectance spectroscopy to predict nitrogen concentration in grasses, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 111, 59–65.

Sloof JE, 1995. Pattern recognition in lichens for source apportionment. *Atmos. Environ.* 29, 333 –343.

Spear FS and Pyle JM, 2002. Apatite, monazite, and xenotime in metamorphic rocks. *Rev. Mineral. Geochem.* 481, 293 –335.

Tan Q, Li J, Zeng X, 2015. Rare earth elements recovery from waste fluorescent lamps: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 457, 749 –776.

- Tang J and Johannesson KH, 2003. Speciation of rare earth elements in natural terrestrial waters: assessing the role of dissolved organic matter from the modeling approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2321–2339.
- Teuten EL, Rowland SJ, Galloway TS, Thompson RC, 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7759–7764.
- Todorova M, Mouazen AM, Lange H, Atanassova S, 2014. Potential of near-infrared spectroscopy for measurement of heavy metals in soil as affected by calibration set size, *Water Air Soil Pollut.* 225, 1–19.
- Thompson RC, Moore CJ, Saal FS, Swan SH, 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 2153–2166.
- Trifuoggi M, Pagano G, Guida M, Palumbo A, Siciliano A, Gravina M, Lyons DM, Burić P, Levak M, Thomas PJ, Giarra A, 2017. Comparative toxicity of seven rare earth elements in sea urchin early life stages. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2425, 20803–20810.
- Trisciani A, Corsi I, Torre CD, Perra G, Focardi S, 2011. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: a field study. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 806–814.
- Tuvikene A, Huuskonen S, Koponen K, Ritola O, Mauer U, Lindstrom-Seppa P, 1999. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environ. Health Perspect.* 107, 745/752.
- Van Cauwenberghe L and Janssen CR, 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70.
- Vandermeersch G, Van Cauwenberghe L, Janssen CR, Marques A, Granby K, Fait G, Kotterman M, Diogène J, Bekaert K, Robbens J, Devriese L, 2015. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environ. Res.* 143, 46–55.
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vane CH, Harrison I, Kim AW, 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the Mersey Estuary, U.K. *Sci. Total Environ.* 374, 112–126.
- Vohland M and Emmerling C, 2011. Determination of total soil organic C and hot water-extractable C from VIS-NIR soil reflectance with partial least squares regression and spectral feature selection techniques, *Eur. J. Soil Sci.* 62, 598–606.

- Wang C, Zhu W, Wang Z, Guicherit R, 2000. Rare earth elements and other metals in atmospheric particulate matter in the western part of the Netherlands. *Water Air Soil Pollut.* 121, 109–118.
- Wei B, Li Y, Li H, Yu J, Ye B, Liang T, 2013. Rare earth elements in human hair from a mining area of China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 696, 118 –123.
- Wilke C, Barkleit A, Stumpf T, Ikeda-Ohno A, 2017. Speciation of the trivalent f-elements Eu(III) and Cm(III) in digestive media. *J. Inorg. Biochem.* 175, 248 –258.
- Wu D, Chen J, Lu B, Xiong L, He Y, Zhang Y, 2012. Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract, *Food Chem.* 135, 2147–2156.
- Xie F, Zhang TA, Dreisinger D, Doyle F, 2014. A critical review on solvent extraction of rare earths from aqueous solutions. *Miner. Eng.* 56, 10 –28.
- Xin N, Meng Q, Li Y, Hu Y, 2012. Near infrared spectral similarity combined with variable selection method in the quality control of Flos Lonicerae: a preliminary study, *Chin. J. Chem.* 29, 2533–2540.
- Yan H, Han BX, Wu QY, Jiang MZ, Gui ZZ, 2011. Rapid detection of *Rosa laevigata* polysaccharide content by near-infrared spectroscopy, *Spectrochim. Acta A* 79, 179–184.
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA, 2013. Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137-7146.
- Zielhuis SW, 2006. Thèse de doctorat. Lanthanide bearing radioactive particles for cancer therapy and multimodality imaging. University Medical Center Utrecht, The Netherlands.

Annexes

Mes 5 publications les plus significatives :

- (A10) Buffet PE, Richard M, Caupos F, **Vergnoux A**, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2013. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). Environ. Sci. Technol. 47, 1620-1628.
IF : 5,48 ; citations : 110 ; Q1 ; doi:10.1021/es303513r
- (A16) Couderc M, Poirier L, **Zalouk-Vergnoux A**, Kamari A, Blanchet-Letrouvé I, Marchand P., Vénisseau A, Veyrand B, Mouneyrac C, Le Bizec B. 2015. Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France. Sci. Total Environ. 505, 199-215.
IF : 4,42 ; citations : 25 ; Q1 ; doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.053
- (A19) Phuong NN, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L, Kamari A, Châtel A, Mouneyrac C, Lagarde F. 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environ. Pollut. 211, 111-123.
IF : 5,10 ; citations : 102 ; Q1 ; doi:10.1016/j.envpol.2015.12.035
- (A20) Van Bohemen AI, **Zalouk-Vergnoux A**, Poirier L, Phuong NN, Inguibert N, Ben Haj Salah K, Ruiz N, Pouchus YF. 2016. Development and validation of LC–MS methods for peptaibol quantification in fungal extracts according to their lengths. J. Chrom. B, 1009–1010, 25-33.
IF : 2,21 ; citations : 5 ; Q1 ; doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.039
- (A23) Phuong NN, Poirier L, Lagarde F, **Zalouk-Vergnoux A**. 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or lifestyle? Mar. Pollut. Bull. 129, 664-674.
IF : 3,24 ; citations : 17 ; Q1 ; doi:10.1016/j.marpolbul.2017.10.054

A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*)

Pierre-Emmanuel Buffet,[†] Marion Richard,^{‡,§} Fanny Caupos,[‡] Aurore Vergnoux,[†] Hanane Perrein-Ettajani,[†] Andrea Luna-Acosta,[‡] Farida Akcha,^{||} Jean-Claude Amiard,[†] Claude Amiard-Triquet,[†] Marielle Guibbolini,[⊥] Christine Risso-De Faverney,[⊥] Helene Thomas-Guyon,[‡] Paul Reip,[#] Agnieszka Dybowska,[▽] Deborah Berhanu,[▽] Eugenia Valsami-Jones,^{▽,○} and Catherine Mouneyrac^{*,†}

[†]Groupe Mer, Molécules, Santé (MMS), Université de Nantes et Université Catholique de l'Ouest, Angers, France

[‡]Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), Université de La Rochelle, France

[§]UMR, 5805 EPOC, Université de Bordeaux 1, Talence, France

^{||}IFREMER, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Rue de L'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

[⊥]ECOMERS, Université de Nice Sophia-Antipolis, France

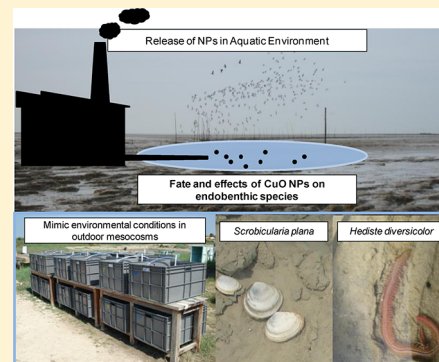
[#]Intrinsic Materials Ltd., Hants, United Kingdom

[▽]Department of Earth Sciences, Natural History Museum London, Cromwell Road, London, SW7 5BD, United Kingdom

[○]University of Birmingham, School of Geography, Earth and Environmental Sciences, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, United Kingdom

Supporting Information

ABSTRACT: The fate and effects of CuO nanoparticles (CuO NPs) were examined in endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*), under environmentally realistic conditions in outdoor mesocosms (exposure to Cu at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ in particulate (CuO NPs) or soluble salt (CuNO₃) forms) for 21 days. Labile Cu was determined in water and sediment by using diffusive gradient in thin films. No labile Cu being detected from CuO NPs; the observed effects in invertebrates exposed to CuO NPs were mainly attributed to the toxicity of nanoparticulate rather than dissolved Cu toxicity. Bioaccumulation of CuO NPs was observed in both species. Biomarkers were examined at different levels of biological organization: biochemical markers of defense and damage, biomarkers of genotoxicity (comet assay), and behavioral biomarkers (feeding and burrowing). Behavioral biomarkers, antioxidant defenses (catalase, glutathion S-transferase, metallothionein), and genotoxicity are the most sensitive tools to highlight the effect of soluble or nanoparticulate metal forms. Concerning other biomarkers of defense (superoxide dismutase, lactate dehydrogenase, laccase) and damage (thiobarbituric acid reactive substances, acetylcholinesterase, acid phosphatase), no significant effects were detected. This experiment shows the suitability of mesocosms for studying the environmental effects of nanoparticles.



INTRODUCTION

Engineered nanoparticles of copper oxide (CuO NPs) are widely used (<http://www.us-nano.com/inc/sdetail/602>), increasing the risk of their introduction into the environment. Once in the aquatic medium, metal-bearing NPs can either be dissolved into the water column, or aggregated, favoring their deposition onto bottom sediment.¹ Thus, endobenthic bivalves and polychaetes could be especially at risk. CuO NPs do not readily dissolve to copper ions in both freshwater^{2–4} and seawater.^{5,6} In our previous paper (Buffet et al.⁵) dealing with fate and effects of CuO NPs from the same batch in seawater, we have shown that (i) CuO NPs, with initial size ranging from 10 to 100 nm, highly aggregated/agglomerated and (ii) the

hydrodynamic size (or Z-average) increased rapidly to values of around 1000 nm. These findings are in agreement with previous studies on CuO NPs, indicating aggregation in seawater (Gomes et al.⁶). It is uncertain whether Cu in labile and the nanoparticulate form is accumulated at the same level in biota and can induce the same stress in animal tissues. In a freshwater gastropod, CuO NPs had greater effects than aqueous Cu on growth, feeding rate, and reproduction.⁷ Recent

Received: August 29, 2012

Revised: December 12, 2012

Accepted: December 16, 2012

Published: December 17, 2012

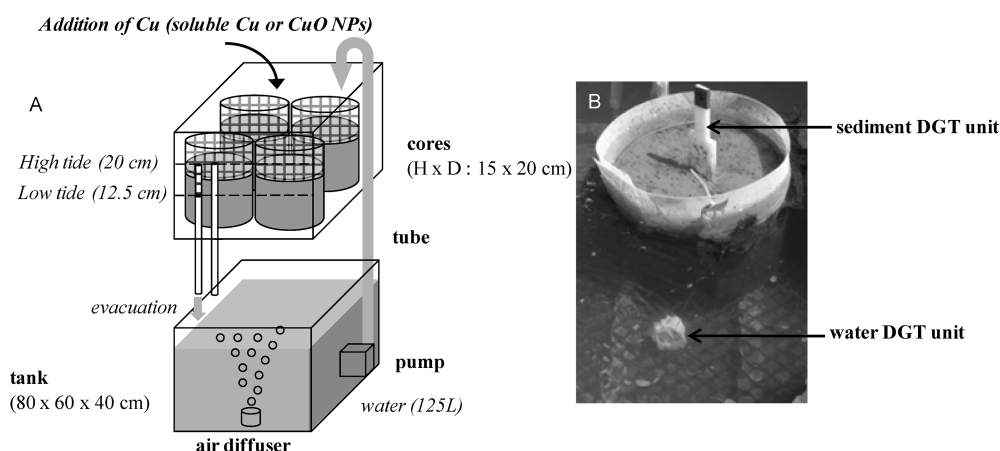


Figure 1. Experimental cores deployed in a mesocosm device equipped with tidal cycle system (A) and positioning of DGT units in sediment and water (B).

studies have shown that CuO NPs have a distinct biological effect not caused entirely by the release of soluble metal ions.^{3,8}

Oxidative stress is one of the most commonly recognized effects of NPs.^{1,9} In vivo studies in *Mytilus galloprovincialis* mussels have revealed that CuO NPs induced oxidative stress in the gills.⁶ In *Hediste diversicolor* and *Scrobicularia plana*, the activity of antioxidant defenses (catalase CAT in both species, superoxide dismutase SOD in clams) was increased with no oxidative damage when considering the levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS).⁵ Genotoxic effects of NPs were observed in *H. diversicolor* exposed to Ag NPs by using the Comet assay on coelomocytes.¹⁰ In *S. plana*, the Comet assay is also a relevant tool to examine genotoxicity in hemocytes.¹¹ Oxidative stress and apoptosis revealed by caspases as biomarkers are documented for different metal NPs, particularly CuO NPs.¹² Metallothionein (MT) is involved in ionic/soluble Cu detoxification¹³ and also in the defense against oxidative stress.¹⁴ In mussels exposed to CuO NPs ($10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$), MT increased linearly with time of exposure.⁶ At the same exposure concentration, a similar trend was observed in the clam *S. plana*.⁵ Acetylcholinesterase (AChE) activity, a biomarker of neurotoxicity was significantly decreased in mussels exposed to NPs,⁶ whereas no significant differences were observed in clams.⁵ Acid phosphatase (AP) and phenoloxidase (PO), two components of immunity, can provide important early warning signals of the sublethal effects of contaminants and the susceptibility of animals to infectious diseases.^{15–17}

Behavioral biomarkers are sensitive tools to assess the impact of contaminants.¹⁸ In the clam *S. plana*, exposure to waterborne CuO NPs affected both burrowing time and feeding rates.⁵

Previous studies were carried out in laboratory microcosms with organisms exposed to NPs in seawater. The aim of the present study was to reach a more environmentally realistic assessment of fate, bioaccumulation and effects of CuO NPs on *S. plana* and *H. diversicolor*, with the use of outdoor mesocosms equipped with a system of tidal cycle. A mesocosm refers to “an experimental system that simulates real-life conditions as closely as possible, while allowing the manipulation of environmental factors”.¹⁹ This experimental strategy has been already used successfully to study the transformations and distribution of manufactured Ag NPs in a freshwater emergent wetland mesocosm²⁰ or in estuarine mesocosms²¹ and the transfer of gold nanoparticles in an estuarine food web.²²

MATERIAL AND METHODS

Implementation of the Mesocosm Approach. Sediments were collected from a relatively clean intertidal mudflat (Bay of Bourgneuf, France; French “Mussel Watch” Program, Réseau National d’Observation, 2006 <http://www.ifremer.fr/envlit/documents/bulletins/rno>). Worms (*H. diversicolor*) and clams (*S. plana*) were gently excluded from the sediment by hand and placed into water with air diffusers. Sediment was mixed before being introduced in experimental cores (Figure 1). Twenty individuals per species were placed in each core at a density ($1000 \text{ individuals m}^{-2}$) commonly observed in intertidal mudflats.²³

Experimental cores were composed of a PVC tube (H: 15 cm, 20 cm Ø) capped with foam for aquarium filter (1–2 mm Ø) and canvas. Four cores were deployed in each mesocosm device (Figure 1), composed of two tanks (H, W, L: 40 × 60 × 80 cm), two evacuation tubes, a hose (16 mm Ø), a pump (Eheim compact 1000 L h⁻¹) and a mechanical timer (IDK PMTF 16A) allowing the mimicking the tidal cycle (6 h of low tide, 6 h of high tide, 2 tides/day). Water was aerated all the time by an air diffuser.

Nine mesocosm devices (36 cores) were installed outside and filled with natural seawater (Saltmarsh of Lauzières, l’Houmeau, France). Three of the nine mesocosm devices were qualified as controls. Three others were contaminated with soluble Cu ($10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ prepared by dilution of pure copper metal in 2% HNO₃, purchased from Fluka), and the latter three were contaminated with CuO NPs (eq $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$). Analytical CuO nanopowder was obtained from a commercial source (supplied by Intrinsic Materials Limited) with the particle primary size specified by manufacturer as 10–100 nm.⁵ A stock suspension of these CuO NPs in deionized water (DIW) (25 mg L^{-1}) was sonicated for 5 min (Ultrasonicator BRANSON B-1200 E2 HF 100 W). Addition of Cu was carried out at the water surface in the upper tank with the experimental cores at high tide in order to mimic the input of Cu-contaminated water in the coastal environment.

The average size of the nanoparticles was determined from transmission electron microscopy (TEM) images (29.5 nm), and the suspension stability was assessed by measuring, in deionized water and seawater, the hydrodynamic size (197 and 810 nm, respectively) and ζ-potential (26.3 and −8.2 mV, respectively) of the CuO NPs and published in Buffet et al.⁵ CuO NPs characterization data are summarized in the

Supporting Information, Table S1 and Figures S1, S2, S3. The hydrodynamic size and ζ -potential of CuO NPs in DIW and in seawater were determined by N.H.M. and published in Buffet et al.⁵ One core per tank was randomly collected after 7 and 14 days of exposure (Figure 1). At 21 days, the remaining two cores were sampled per tank. Worms and bivalves were gently sorted by hand and stocked into aerated water before tests.

Every three days at 2 P.M. (local time UT + 2), temperature, salinity, and dissolved oxygen were measured in control tanks, using probes (WTW 31Si, OXI 3310). Nitrates and nitrites were controlled in each tank with NO₂, nitrite, and NO₃, nitrate, tests sets JBL (JBL GmbH & Co.). In addition, a Micrel probe was deployed into one of the three control tanks. It recorded temperature and salinity every 15 min during all the experiment. After 7, 14, and 21 days, sediment was collected using a cut-off 60 mL disposable syringe to determine chlorophyll *a* (Chl *a*) and phaeophytin *a* (Phaeo *a*) concentrations in the top 1 cm of sediment cores.

Characterization of Exposure. Widely available instruments do not yet permit the characterization of NPs in sediment. Nevertheless, labile Cu was estimated in both the water column and the sediment by using DGT tools purchased from DGT Research Ltd. (Lancaster, U.K.). DGT units were used for the water compartment (loaded solution deployment unit C-LSDU), and other DGT units were used for sediments (loaded sediment probe for metals C-LSPM). Three water DGT and three sediment DGT units were deployed in each mesocosm (9 mesocosms: a total of 27 units). At day 7, 14, and 21, one water DGT unit and one sediment DGT unit were removed for each mesocosm device (3 DGT units per treatment: control, soluble Cu, and CuO NPs). To evaluate potential contamination during the deployment, three water and sediment DGT units used as blanks were deployed and analyzed in the same conditions as the others.

After sampling, DGT units were washed with ultrapure water (Milli-Q). For the water DGT units, the totality of the resin was placed in 2 mL vials, whereas for the sediment DGT units, the resin was cut every cm and then each piece was placed in a 2 mL vial. 1.5 mL of 1 M HNO₃ was added to the vials and left for more than one day to dissolve Cu from the Chelex resin. Cu quantification of these neat or diluted solutions was performed by electrothermal atomic absorption spectrometry (EAAS) (Varian SpectrAA 800).

Copper Bioaccumulation. Copper was determined in the whole soft tissues of bivalves and worms that had been allowed to depurate in seawater for 48 h ($n = 10$ per condition, for each species). Animal tissues were digested by heating (90 °C) with Aqua Regia (HCl/HNO₃ 75/25). Then, the quantification of Cu concentrations was performed by using flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS, Varian SpectrAA55 spectrophotometer) in ragworms, whereas analyses in clams were performed using EAAS. The accuracy of the analyses was checked by using internal quality control with standard reference material (mussel tissue SRM 2976, National Institute of Standards and Technology). Three measurements were achieved, and results ($4.481 \pm 0.156 \mu\text{g g}^{-1}$) were in agreement with the certificate of analysis ($4.02 \pm 0.33 \mu\text{g g}^{-1}$).

Biochemical Markers. For each biomarker, clams and ragworms were collected at day 21 from three cores, each of them selected at random in one of the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (control, exposure to soluble Cu, or exposure to CuO NPs). The total weight of clams was determined; then, the

worms and the soft tissues of clams were weighed individually and stored at -80 °C until biochemical analysis. The condition index of clams was calculated as follows:

$$\text{CI} = (\text{total fresh tissue weight} / \text{total weight}) / 100 \quad (1)$$

Methodologies applied for the determination of biochemical markers (MT, GST, LDH, CAT, SOD, TBARS, AChE) have been described in detail by Buffet et al.⁵ MT analysis was performed only in *S. plana*, since MT is not relevant as a biomarker in *H. diversicolor*.²⁴ Briefly, MTs were quantified by differential pulse polarography (DPP) analysis²⁵ after partial purification in soft tissue homogenates. Lipid peroxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), quantified by reference to MDA absorbance at 530 nm.²⁶ For GST, CAT, SOD, AChE, and LDH activities, tissues were homogenized and enzyme activities were determined spectrophotometrically in the enzyme fraction (S9 fraction), as described by Habig et al.²⁷ for GST, Claiborne²⁸ for CAT, McCord and Fridovich²⁹ for SOD, Galgani and Bocquene³⁰ for AChE, and Diamantino et al.³¹ for LDH.

CSP3-like activity was determined by measuring the release of aminotrifluoromethylcoumarin (AFC) from the caspase tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). After homogenization of the pooled soft tissues, an aliquot of S9 was mixed with buffer B (312.5 mM HEPES pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3% CHAPS, 50 a.m. of DEVD-AFC). The fluorescence of free AFC was measured by using a fluorometer (Safas FLX Xenius, Monaco) at an excitation/emission wavelength of 390/530 nm every 3 min for 45 min. CSP3-like activities were expressed in pmoles AFC min⁻¹ mg⁻¹ protein, according to a standard curve obtained from AFC. AP activity was determined according to the method of Bergmeyer et al.,³² by using the Sigma Acid Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, France). Laccase-type PO activity was determined according to methodology described previously,³³ by using *p*-phenylenediamine (PPD) as substrate. The protocol assay was adapted to *H. diversicolor* and *S. plana* samples (data not shown).

All the results were expressed with reference to protein concentrations determined according to Bradford.³⁴ For MT, LDH, AP, and laccase-type PO, and digestive enzymes, determinations were carried out individually ($n = 10$ per species and per treatment, control, and Cu, either soluble or as CuO NPs). For GST, CAT, SOD, TBARS, AChE, and CSP3-like determinations were carried out on 5 pools of 3 individuals per species and per treatment.

Comet Assay. After exposure, *H. diversicolor* ($n = 10$) and *S. plana* ($n = 7$) were collected at day 21 from one core selected at random in the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (control, exposure to soluble Cu, or exposure to CuO NPs). Coelomocytes of worms were taken by carefully inserting a syringe into the posterior region of the worm. Using the same procedure, hemocytes of clams were taken from the adductor muscle. The blood cells were mixed with PBS then stored on ice briefly before use. Before the assay was performed, viability of cell was determined by a trypan-blue exclusion test. A rate of cellular viability above 85%³⁵ validated the condition of the test limiting measurement of broken DNA from death cells.

The Comet assay is a modified version of that previously described by Singh et al.³⁶ Positive controls consisting of cell exposed in vitro for 10 min to 100 μM hydrogen peroxide were

carried out in parallel to ensure the validity of measurements. All steps described were conducted under dim red light and performed at 4 °C to prevent any DNA damage. The cell suspension was carefully mixed with 1% low melting point agarose and was transferred onto a conventional microscope slide precoated with 0.8% normal melting point agarose. The gel was solidified on ice for 10 min, and the coverslip was removed. A third layer of 0.5% low melting point agarose was added. Slides were left on ice again for 10 min to solidify before the coverslip was removed. Then, slides were immersed in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 1% N-laurylsarcosinate, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO added immediately before use) for 2 h. After lysis, slides were washed with an alkaline buffer (1 mM Na₂EDTA and 300 mM NaOH, pH > 13) and placed in a horizontal electrophoresis tank filled with the same buffer for 45 min to unwind DNA. Electrophoresis was then performed for 21 min at 15 V, 300 mA. At the end of the electrophoresis, slides were washed twice (10 min) in a neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), dehydrated in absolute ethanol (5 min), and taken out to dry. Nuclear DNA was stained with 30 μ L of ethidium bromide (20 μ g mL⁻¹) and observed using an optical fluorescence microscope (BX 60 Olympus) coupled to an Andor camera and an image analysis system (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). For each animal, one slide was prepared. On each slide, 75 nonoverlapping comets were scored randomly on the all gel surface of the slide. DNA damages were expressed as the percentage of broken DNA in the comet tail.

Behavioral Experiments. Behavioral tests were carried out with animals collected from three cores, each of them selected at random in one of the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (control, exposure to soluble Cu, or exposure to CuO NPs). Burrowing experiments were carried out with natural sediment collected from the sampling site.

Clams ($n = 20$ per treatment) were submitted to burrowing tests at day 21, as described by Bonnard et al.³⁷ Burrowing behavior was studied by placing individuals at the sediment surface and observing the number that had burrowed at frequent intervals; every 5 min in the first hour, every 10 min in the second hour, every 20 min in the third and fourth hours, and then every hour until 6 h of testing.

Automated behavioral toxicity tests with ragworms *H. diversicolor* were carried out with the multi-freshwater biomonitor (MFB) and primarily developed using two individuals. One end of each chamber of the MFB was closed with mesh, and the other was open in order to visually identify the animal movements. The chambers were placed vertically in plastic tank with a shallow layer of sediment and topped up with 1 L seawater. The lower half of the chamber was filled with sediment, and *H. diversicolor* was placed at the surface within each chamber and given 1 h to acclimate before MFB recording. The behavioral patterns were analyzed visually by observing *H. diversicolor* movements in combination with the MFB oscilloscope signals. Polychaetes ($n = 7$ per treatment) collected at day 7 and day 14 were added individually to each test chamber. One chamber without organisms was used as control for noise signals. The MFB recordings started after 1 h acclimation and were made over a 7 h period.

Post exposure feeding tests were carried out at day 14 for both species ($n = 30$ clams per treatment, $n = 20$ ragworms per treatment). The feeding rate of *S. plana* ($n = 30$ per treatment) was quantified according to the methodology described by

Worrall and Widdows.³⁸ *Tetraselmis suecica* algae obtained from the Nantes Cultures Collection of MMS (strain NCC62) were used as food (10 000 cell mL⁻¹) in each of three replicated aquaria containing 2 L of seawater ($n = 10$ specimens per aquaria) for each treatment. The concentration of algae not ingested by bivalves was measured after 1 h.

The feeding rate of *H. diversicolor* was quantified, as described by Moreira et al.³⁹ Twenty worms were fed 100 *Artemia salina* larvae in individual plastic beakers. They were left undisturbed for 1 h; then, the remaining larvae were counted.

Statistical Treatment. Results are presented as means $\pm$ standard deviations. The assumptions of normality and homoscedasticity of all results were evaluated using Shapiro–Wilk and Fisher tests to choose appropriate parametric or nonparametric statistics and to compare treatments (controls, soluble Cu, and CuO NPs). Thus, an ANCOVA with post hoc Tukey test was performed on burrowing kinetic data, a two-way ANOVA (treatments and species) was performed on comet assay data, and Mann–Whitney tests were performed on data from other biomarkers. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

RESULTS

Biotic and Abiotic Factors. At the end of the experiment (21 days), no mortality was observed. For each treatment, the condition index determined for 100 clams did not show any significant difference between treatments (controls, 26 ± 5 ; soluble Cu, 25 ± 6 ; CuO NPs, 25 ± 6).

Chlorophyll *a* ($27.7 \pm 2.05 \mu\text{g g}^{-1}$ dw) and Phaeophytin *a* ($25.3 \pm 1.7 \mu\text{g g}^{-1}$ dw) did not significantly vary according to treatment and time (7, 14, 21 days). Water temperature varied daily with maximal mean observed at 3 P.M. (23.6 ± 2.6 °C) and minimal mean recorded at 6:30 A.M. (12.8 ± 2 °C). During the experiment, temperature varied between 18.5 and 25.5 °C at 2 P.M. Salinity was regularly adjusted with an addition of water purified by reverse osmosis (RO). Nitrate concentration did not significantly vary during the experiment ($<0.5 \text{ mg L}^{-1}$). At the beginning of the experiment, nitrite concentration was above 0.1 mg L^{-1} . It decreased after 7 days to become constant at $<0.01 \text{ mg L}^{-1}$. The mean of oxygen saturation was $97.1 \pm 0.6\%$. The mean oxygen concentration was $8.5 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$.

Fate of CuO NPs in the Experimental Medium. Figure S4 (Supporting Information) shows Cu masses accumulated by water DGT units, and Figure S5 (Supporting Information) shows Cu masses accumulated by the sediment DGT units during the 21 days of experiment for each treatment (control, soluble Cu, CuO NPs). Accumulated Cu by water DGT units was significantly higher in mesocosms exposed to soluble Cu than in control mesocosms whatever the experiment time (7, 14, 21 days; Figure S4, Supporting Information). Throughout the 21 days, Cu accumulated by water DGT units from mesocosms contaminated with CuO NPs was not significantly different from that accumulated by DGT units deployed in control. DGT units in sediments (Figure S5, Supporting Information) have shown that no more labile Cu was accumulated in sediment cores with Cu added as CuO NPs than in controls. These results indicate that no detectable release of labile Cu from NPs occurred. Some significant differences were observed in the sediment at day 21, with peaks at -5 cm in controls and at -10 cm in mesocosms contaminated with soluble Cu. Bioturbation operated by

Table 1. Means $\pm$ Standard Deviation (SD) of Biomarkers Quantified in *Hediste diversicolor* and *Scrobicularia plana* Exposed to the Experimental Conditions (Controls, Soluble Cu, CuO NPs)^a

		<i>S. plana</i>			<i>H. diversicolor</i>		
		control	soluble Cu	CuO NPs	control	soluble Cu	CuO NPs
defense (21 d exposure)	MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ tissues)	1477 (250) ^a	2122 (242) ^b	1947 (285) ^b			
	GST ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	222 (10) ^a	266 (10) ^b	354 (27) ^c	72 (12) ^a	86 (3) ^a	113 (5) ^b
	CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	67 (13) ^a	93 (12) ^b	116 (18) ^b	69 (4) ^a	109 (16) ^b	124 (14) ^b
	CSP3-like ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	1.25 (0.05) ^a	1.27 (0.05) ^a	1.38 (0.06) ^b	1.17 (0.08) ^a	1.24 (0.04) ^a	1.26 (0.07) ^b
	TBARS (nmol MDA mg^{-1} protein)	0.47 (0.07) ^a	0.44 (0.06) ^a	0.52 (0.13) ^a	0.82 (0.05) ^a	0.70 (0.11) ^a	0.66 (0.06) ^b
behavior	burrowing slope (21 d exposure)	−0.0139 ^a	−0.0057 ^b	−0.0083 ^c			
	feeding rate (14 d exposure)	3587 (1762) ^a	3963 (1766) ^a	1517 (1182) ^b	81 (11) ^a	82 (14) ^a	79 (19) ^a

^aFor both species, biomarker levels with different superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

benthic species and the presence of animal burrows close to DGT units could explain these observations.

Copper Bioaccumulation. The results are depicted in Figure S6 in the Supporting Information. In *S. plana* clams, Cu concentrations in the whole soft tissues were significantly higher for both Cu treatments than in controls, the concentrations being significantly higher in those exposed to soluble Cu compared to those exposed to CuO NPs. For the *H. diversicolor* ragworms, body concentrations were significantly higher only in worms exposed to CuO NPs.

Biochemical Markers. The results are shown in Table 1. In clams, MT concentrations were significantly higher in specimens exposed to both forms of Cu. For defense biomarkers, no significant differences were detected in either species concerning SOD and LDH activities (not shown). On the other hand, GST and CAT activities were higher in both species and both Cu treatments with the exception of GST activity in ragworms exposed to soluble Cu. GST activity in clams was significantly higher in the presence of Cu as CuO NPs than that as soluble Cu.

Only few biomarkers of damage showed significant changes: in clams, CSP activity was increased in the presence of CuO NPs, whereas this treatment led to a decrease of TBARS levels in ragworms. No significant differences on immune responses (AP and laccase-type PO) were detected in both species.

Comet Assay. The cellular viabilities were between 92 and 96% in clams and between 86 and 91% in ragworms. Genotoxic damages in animals from controls and exposed to both Cu forms (soluble and nanoparticulate) were always lower than the positive control (H_2O_2). The percentage of tail DNA in worm coelomocytes was significantly higher compared to clams hemocytes (Figure 2). In both species, percentages of tail DNA were enhanced for soluble Cu and CuO NP treatments. No significant difference was detected between the two Cu treatments in both species after 21 days of exposure.

Behavioral tests. In *S. plana* clams, at day 21, the burrowing kinetics was significantly affected in clams exposed to both forms of Cu (soluble Cu and CuO NPs). Burrowing speed was significantly lower after exposure to soluble Cu than to CuO NPs (Table 1).

For *H. diversicolor*, two different movements can be characterized: (i) undulation associated with burrowing, occurring at 0.5 Hz frequency, and (ii) head movement associated with feeding, occurring at 1 to 2 Hz. The average time spent in burrowing/undulation and head movement/feeding behaviors are depicted in Figure 3. No significant difference was observed after 7 days of exposure to both forms

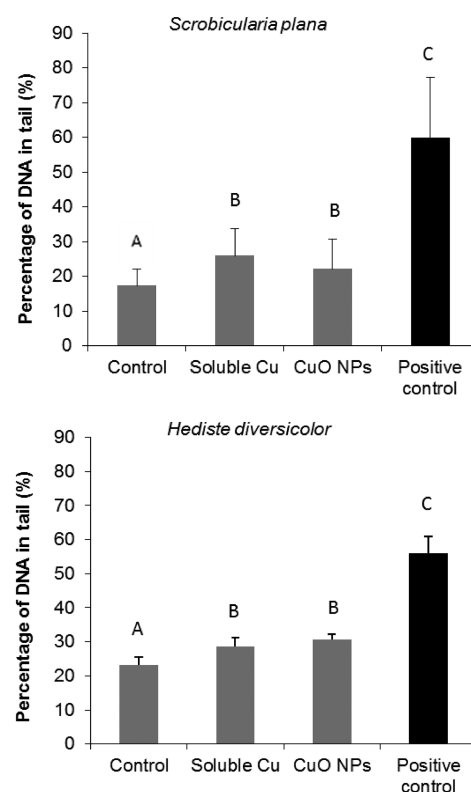


Figure 2. DNA damage in (A) hemocytes of *S. plana* and (B) coelomocytes of *H. diversicolor* exposed to the experimental conditions (control, soluble Cu, CuO NPs) expressed as percentage of DNA in the comet tail of blood cells. For both species, biomarker levels with different capital letters differed significantly ($p < 0.05$).

of Cu, whereas the two activities had significantly decreased for worms exposed during 14 days to soluble Cu and CuO NPs.

Results of feeding rates determined at day 14 (Table 1) showed a significant reduction in clams exposed to CuO NPs. In ragworms, no effect of Cu contamination was shown.

DISCUSSION

In the course of the present experiments, ecological conditions remained favorable with good oxygenation, absence of increased levels of nitrites, and conservation of a biofilm with chlorophyll *a* in the range of natural concentrations.⁴⁰ Survival of both studied species and individual fitness were not negatively affected. Condition indexes of clams were equal or

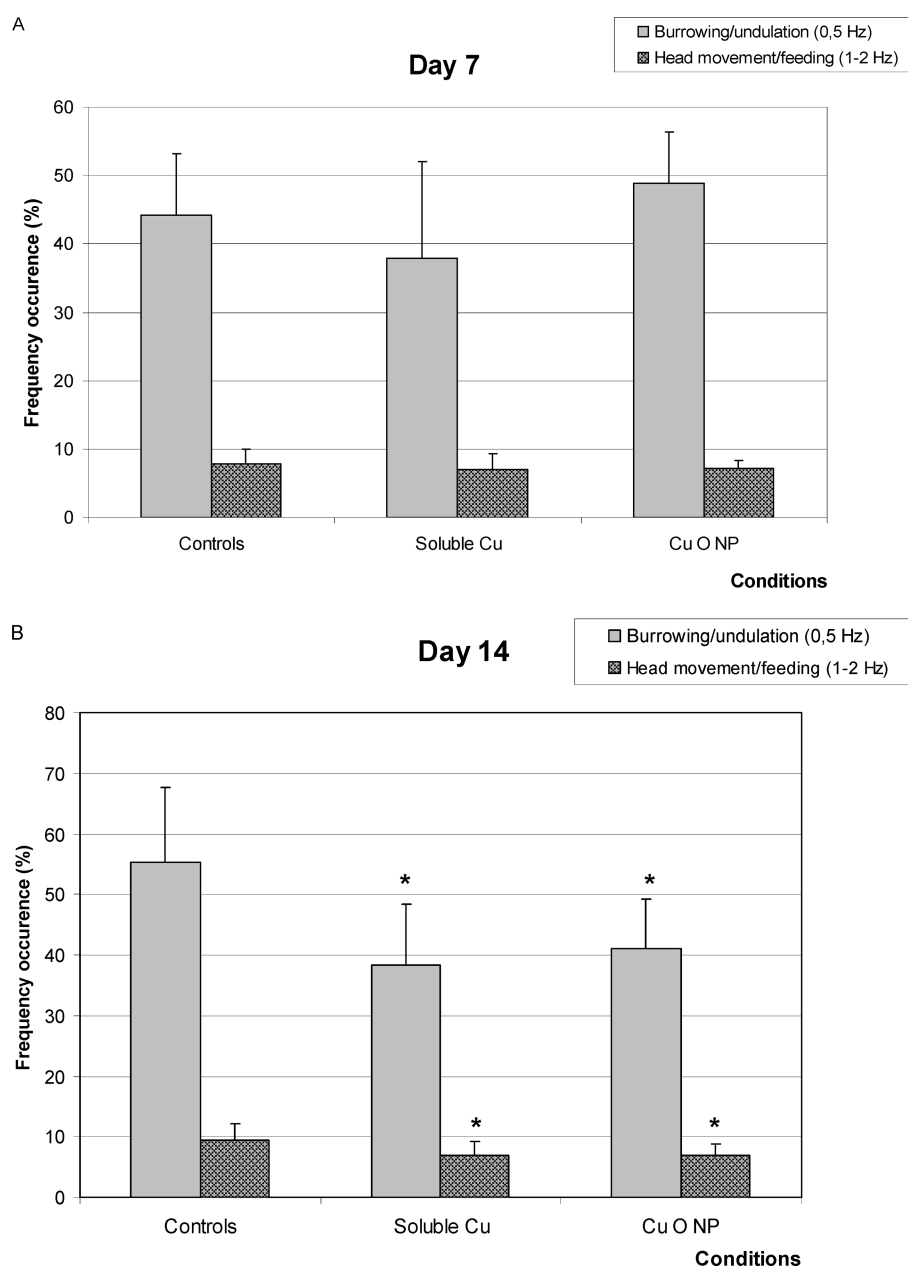


Figure 3. Average frequency (%) ($\pm$ error) of burrowing/undulation (0.5 Hz) and head movements/feeding of *H. diversicolor* ($n = 7$) exposed to the experimental conditions (control, soluble Cu, and CuO NPs) after (A) 7 days and (B) 14 days of exposure. Asterisks indicate significant differences with control treatment ($p < 0.05$).

even higher than those encountered in field studies in the same geographical area.²³

The aggregation of CuO NPs from the same batch has been shown in seawater,⁵ a behavior favoring their deposition onto bottom sediment. As observed previously in water alone,⁵ no Cu release from the CuO NPs occurred in the water column and porewater. These findings are in agreement with many other studies indicating a poor dissolution of CuO NPs in seawater.^{2–6}

Levels of labile Cu in the water column of both treatments (soluble Cu and CuO NPs) were lower in the present study than previously observed in waterborne contamination;⁵ the labile Cu is probably adsorbing to the sediment present in the mesocosms. While a decreased uptake was expected compared to our previous study,⁵ an increase was observed probably due to the fact that Cu body burdens determined in the present

study result from the uptake of both Cu forms, labile and particulate (labile Cu sourced either from CuO NPs or soluble Cu adsorbed to natural fine sediment particles). Bioaccumulation of CuO NPs has already been established in gastropods⁷ and fish.⁸ As highlighted in mussel gills,⁶ *H. diversicolor* ragworms, and *S. plana* clams, the rate of accumulated Cu depends on the form introduced in the experimental medium (CuO NPs or soluble Cu). Cu uptake was higher in clams exposed to soluble Cu vs CuO NPs, whereas in worms the opposite was observed. These interspecies differences could be related to different lifestyles of species. Bivalves filter large volumes of water whereas worms may be preferentially exposed to deposited NPs by ingestion of sediment particles.⁴¹

Due to their small size and high surface area, coupled to other physicochemical features such as metal content and charged/capped surfaces, nanomaterials may well have

unpredictable genotoxic properties.⁴² In vivo studies showed DNA damage in plants exposed to CuO NPs,⁴³ bivalves exposed to nanoiron,⁴⁴ and ragworms exposed to Ag NPs.¹⁰ In contrast, no significant increase in DNA damage was observed in lugworms exposed in vivo to single walled nanotubes.⁴⁵ The present study gives the first evidence for DNA damage revealed by comet assay in marine bivalves and worms exposed to CuO NPs and also to soluble Cu. Indeed, Cu as a redox active metal is an oxidative stress inducer,⁴⁶ promoting the formation of highly reactive oxygen species affecting DNA integrity.⁴⁷ As shown by Park et al.⁴⁸ in cultured cells exposed to TiO₂ NPs, in the present study, the oxidative stress by CuO NPs triggered the activation of cytosolic CSP suggesting that these NPs exert cytotoxicity by an apoptotic process. These effects were observed despite the fact that both species induce antioxidant defenses (CAT activity in both species, increased MT concentration in clams) and enhanced GST activity, a phase II enzyme that catalyzes the GSH conjugation to endogenous aldehydic products of lipid peroxidation.⁴⁶ Antioxidant defenses responded similarly when clams and ragworms were exposed to both forms of waterborne Cu.⁵ For TBARS, the only significant difference was the decrease observed in ragworms exposed to CuO NPs in mesocosms. Surprisingly, TBARS concentrations resulting from lipid peroxidation were not increased in exposed invertebrates, although genotoxicity was observed. Similar observations⁴⁹ in fish exposed to dietary TiO₂ NPs were explained as probably resulting from up-regulating of antioxidant defenses. However, in mussels' gills exposed using the same protocol applied in the present study, oxidative damage due to CuO NPs was evidenced by a breakdown of the antioxidant defense system and lipid peroxidation, as well as MT induction.⁶ Since no significant differences were detected in either species for the pollution-induced immunomodulation biomarkers determined in the present study, effects with longer times of exposure should be examined more closely.

Impairment of behavior is well documented in the case of both soluble Cu and CuO NPs in invertebrates (Bonnard et al.,³⁷ and literature cited therein^{5,50,51}). The behavior of ragworms (feeding and burrowing) was never affected by CuO NPs, and burrowing was only affected after soluble Cu. In the present study, the MFB provided a better sensitivity of behavioral test, since significant differences were observed between controls and Cu (both soluble Cu and CuO NPs). As observed with waterborne Cu contamination,^{5,37} behavioral impairments were not accompanied by an inhibition of AChE activity, but physiological disturbances could be the cause. Slower burrowing by endofauna could make it more vulnerable to predators in environments impacted by CuO NPs.

This is the first experiment with endobenthic species exposed to Cu as soluble and NP forms under environmentally realistic conditions: doses of Cu, presence of biofilm, tidal cycle effect, and natural weather fluctuations. The findings revealed effects at different levels of biological organization from biochemical to individual responses, including biomarkers of ecological relevance such as behavioral and genotoxic effects. The most striking feature was the increased detoxification mechanism and apoptosis induction in both species exposed to CuO NPs vs soluble Cu. Finally, in agreement with previous works, this study highlights again that CuO NPs are not easily dissolved in our experimental medium and, consequently, defense mechanisms and toxic effects may be the result of a specific NP effect.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Characterization data summary, TEM image, hydrodynamic size, concentration of Cu²⁺ released from nanoparticles suspension, mean masses of Cu accumulated by DGT units in the water column and sediment, Cu concentrations in whole soft tissues of *S. plana* and *H. diversicolor*. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33241816645. Fax: +33241816674. E-mail: catherine.mouneyrac@uco.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 214478 (NanoReTox). Thanks are due to P. Bustamante, D. Vilday, M. Prineau, V. Huet (LIENSs, University of La Rochelle), M. L. Begout, D. Leguay, J. M. Chabirand, B. Charrier (IFREMER, L'Houmeau), O. Fossi Tankoua, M. Bonnard, P. Gaudin, G. Meynard, S. Dupouey, G. Wielgosz-Collin, and A. Couzinet-Mossion (MMS University of Nantes) for their valuable help in the implementation of the whole experiment.

■ REFERENCES

- (1) Klaine, S. J.; Alvarez, P. J. J.; Batley, G. E.; Fernandes, T. F.; Handy, R. D.; Lyon, D. Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M. J.; Lead, J. R. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1825–1851.
- (2) Griffitt, R. J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.-C.; Barber, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1972–1978.
- (3) Heinlaan, M.; Kahru, A.; Kasemets, K.; Arbeille, B.; Prensier, G.; Dubourguier, H.-C. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. *Water Res.* **2011**, *45* (1), 179–190.
- (4) Manusadzianas, L.; Caillet, C.; Fachetti, L.; Glytè, B.; Grigutyte, R.; Jurkonienė, S.; Karitonas, R.; Sadauskas, K.; Thomas, F.; Vitkus, R.; Féard, J.-F. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31* (1), 108–114.
- (5) Buffet, P.-E.; Fossi-Tankoua, O.; Pan, J.-F.; Berhanu, D.; Herrenknecht, C.; Poirier, L.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.-C.; Bérard, J.-B.; Risso, C.; Guibolini, M.; Roméo, M.; Reip, P.; Valsami-Jones, E.; Mouneyrac, C. Behavioral and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* **2011**, *84* (1), 166–174.
- (6) Gomes, T.; Pinheiro, J. P.; Cancio, I.; Pereira, C. G.; Cardoso, C.; Bebianno, M. J. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (21), 9356–9362.
- (7) Pang, C.; Selck, H.; Misra, S. K.; Berhanu, D.; Dybowska, A.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *106–107* (9), 114–122.
- (8) Griffitt, R. J.; Hyndman, K.; Denslow, N. D.; Barber, D. S. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2009**, *107* (2), 404–415.

- (9) Canesi, L.; Ciacci, C.; Fabbri, R.; Marcomini, A.; Pojana, G.; Gallo, G. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* **2012**, *76*, 16–21.
- (10) Cong, Y.; Banta, G. T.; Selck, H.; Berhanu, D.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105* (3–4), 403–411.
- (11) Petridis, P.; Jha, A. N.; Langston, W. J. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquat. Toxicol.* **2009**, *94* (1), 8–15.
- (12) Ahamed, M.; Akhtar, M. J.; Siddiqui, M. A.; Ahmad, J.; Musarrat, J.; Al-Khedhairi, A. A.; AlSalhi, M. S.; Alrokayan, S. A. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* **2011**, *283* (2–3), 101–108.
- (13) Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76* (2), 160–202.
- (14) Buico, A.; Cassino, C.; Dondero, F.; Vergani, L.; Osella, D. Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: An ESR study. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (4), 921–927.
- (15) Gagnaire, B.; Gay, M.; Huvet, A.; Daniel, J.-Y.; Saulnier, D.; Renault, T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84* (1), 92–102.
- (16) Hannam, M. L.; Bamber, S. D.; Moody, J. A.; Galloway, T. S.; Jones, M. B. Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquat. Toxicol.* **2009**, *92* (3), 187–194.
- (17) Luna-Acosta, A.; Bustamante, P.; Godefroy, J.; Fruitier-Arnaudin, I.; Thomas-Guyon, H. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2010**, *17* (4), 999–1008.
- (18) Amiard-Triquet, C. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2009**, *15* (1), 87–110.
- (19) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Biosafety of Genetically Modified Organisms: Basic concepts, methods and issues*; FAO: Rome, 2009.
- (20) Lowry, G. V.; Espinasse, B. P.; Badireddy, A. R.; Richardson, C. J.; Reinsch, B. C.; Bryant, L. D.; Bone, A. J.; Deonarine, A.; Chae, S.; Therezien, M.; Colman, B. P.; Hsu-Kim, H.; Bernhardt, E. S.; Matson, C. W.; Wiesner, M. R. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (13), 7027–7036.
- (21) Cleveland, D.; Long, S. E.; Pennington, P. L.; Cooper, E.; Fulton, M. H.; Scott, G. I.; Brewer, T.; Davis, J.; Petersen, E. J.; Wood, L. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products. *Sci. Total Environ.* **2012**, *421–422*, 267–272.
- (22) Ferry, J. L.; Craig, P.; Hexel, C.; Sisco, P.; Frey, R.; Pennington, P. L.; Fulton, M. H.; Scott, I. G.; Decho, A. W.; Kashiwada, S.; Murphy, C. J.; Shaw, T. J. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nat. Nano* **2009**, *4* (7), 441–444.
- (23) Fossi Tankoua, O.; Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Berthet, B.; Mouneyrac, C.; Rainbow, P. S. Towards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine ecosystems. *ICES CM Documents 2010*; International Council for the Exploration of the Sea: Copenhagen, Denmark, 2010; Theme Session F, F:15.
- (24) Poirier, L.; Berthet, B.; Amiard, J.-C.; Jeantet, A.-Y.; Amiard-Triquet, C. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **2006**, *86* (1), 71–82.
- (25) Mouneyrac, C.; Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Cottier, A.; Rainbow, P. S.; Smith, B. D. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: A cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **2002**, *57* (4), 225–242.
- (26) Halliwell, B.; Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press: Oxford, 1985.
- (27) Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (22), 7130–7139.
- (28) Claiborne, A., *Catalase Activity*. CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, 1985.
- (29) McCord, J. M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (22), 6049–6055.
- (30) Galgani, F.; Bocquene, G. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Res.* **1991**, *25* (2), 147–150.
- (31) Diamantino, T. C.; Almeida, E.; Soares, A. M. V. M.; Guilhermino, L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* **2001**, *45* (4–5), 553–560.
- (32) Bergmeyer, H. U.; Gawehn, K.; Grassi, M., *Methods of Enzymatic Analysis*; Academic Press Inc.: New York, 1974; Vol. 1.
- (33) Luna-Acosta, A.; Rosenfeld, E.; Amari, M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Bustamante, P.; Thomas-Guyon, H. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immun.* **2010**, *28* (4), 719–726.
- (34) Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (35) Benhusein, G. M.; Mutch, E.; Aburawi, S.; Williams, F. M. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan J. Med.* **2010**, *5*.
- (36) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175* (1), 184–191.
- (37) Bonnard, M.; Eom, I.-C.; Morel, J.-L.; Vasseur, P. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. *Environ. Mol. Mutagen.* **2009**, *50* (1), 60–67.
- (38) Worall, C. M.; Widdows, J. Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1983**, *12*, 281–287.
- (39) Moreira, S. M.; Moreira-Santos, M.; Guilhermino, L.; Ribeiro, R. A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24* (8), 2010–2018.
- (40) Underwood, G. J. C.; Kromkamp, J. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In *Advances in Ecological Research*; Nedwell, D. B., Raffaelli, D. G., Eds.; Academic Press: London, 1999; Vol. 29, pp 93–153.
- (41) Solé, M.; Kopecka-Pilarczyk, J.; Blasco, J. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ. Int.* **2009**, *35* (3), 523–531.
- (42) Xie, H.; Mason, M. M.; Wise, J. P. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health* **2011**, *26*, 251.
- (43) Atha, D. H.; Wang, H.; Petersen, E. J.; Cleveland, D.; Holbrook, R. D.; Jaruga, P.; Dizdaroglu, M.; Xing, B.; Nelson, B. C. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (3), 1819–1827.
- (44) Kadar, E.; Tarran, G. A.; Jha, A. N.; Al-Subiai, S. N. Stabilization of engineered zero-valent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (8), 3245–3251.
- (45) Galloway, T.; Lewis, C.; Dolciotti, I.; Johnston, B. D.; Moger, J.; Regoli, F. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (5), 1748–1755.

(46) Regoli, F.; Bocchetti, R.; Filho, D. W. Spectrophotometric assays of antioxidants. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*; John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex, U.K., 2011; pp 367–380.

(47) Ozawa, T.; Ueda, J.; Shimazu, Y. DNA single strand breakage by copper(II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1993**, *31*, 455–461.

(48) Park, E.-J.; Yi, J.; Chung, K.-H.; Ryu, D.-Y.; Choi, J.; Park, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* **2008**, *180* (3), 222–229.

(49) Ramsden, C.; Smith, T.; Shaw, B.; Handy, R. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: No effect on growth but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* **2009**, *18* (7), 939–951.

(50) Pang, C.; Selck, H.; Misra, S. K.; Berhanu, D.; Dybowska, A.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *106–107*, 114–122.

(51) Townsend, M.; Hewitt, J.; Philips, N.; Coco, G. *Interactions between Heavy Metals, Sediment, and Cockle Feeding and Movement*, Technical Report TR 2010/023; Auckland Regional Council: Auckland, New Zealand, 2009; p 51.



Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France



M. Couderc^{a,*}, L. Poirier^a, A. Zalouk-Vergnoux^a, A. Kamari^a, I. Blanchet-Letrouvé^a, P. Marchand^b, A. Vénisseau^b, B. Veyrand^b, C. Mouneyrac^c, B. Le Bizec^b

^a LUNAM Université, Université de Nantes, MMS, EA 2160, Nantes F-44322, France

^b LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes F-44307, France

^c LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, MMS, EA 2160, Angers F-49000, France

HIGHLIGHTS

- Levels and trends of PCBs, PBDEs, PFAS, OH-PAHs, APs and BPA were studied in eels.
- High variabilities in contaminant levels regarding site and life stage were found.
- Intermediate levels of POPs and BPA were found compared to European data.
- All eels had PBDE concentrations above the EQS and 75% had PFOS levels above the EQS.
- One third of yellow eels had PCB TEQ levels upper than the regulated maximum limit.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Received in revised form 17 September 2014

Accepted 17 September 2014

Available online 16 October 2014

Editor: Adrian Covaci

Keywords:

PBDEs

PCBs

PFAS

PAH metabolites

Alkylphenols

BPA

ABSTRACT

The chemical contamination of the Loire estuary by three classes of persistent organic pollutants (POPs): the polychlorinated biphenyls (PCBs), the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and the perfluorinated and polyfluorinated alkyl substances (PFAS), and three families of organic contaminants, the alkylphenols (APs), the polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAHs) and the bisphenol A (BPA) were investigated in the muscles and bile of European eel (*Anguilla anguilla*). Yellow eels ($n = 30$) were caught in three different points along the estuary to highlight variations between sites and sources of contaminations. Silver eels ($n = 15$) were also studied to compare contaminant impregnation between different life stages of the species. Average concentrations in the muscles of the eel ranged between: 857 and 4358 ng/g LW for the PCBs, 26 and 46 ng/g LW for the PBDEs, 130 and 1293 ng/g LW for the PFAS; and in bile: 31 and 286 µg/g protein for the APs, 9 and 26 µg/g protein for the OH-PAHs and ND-1213 µg/g protein for the BPA. Among PCBs, PCB 153 (40% contribution to the sum of PCBs) was predominant in all eel muscles. PBDE 47 (60%) was the most predominant PBDE congeners, while perfluorooctanesulfonic acid (85%) was the most widely detected PFAS. For APs, 4p-nonylphenol (91%) was the most abundant and for the OH-PAHs, it was 1OH-Pyrene (63%). All the eels exceeded the environmental quality standards (EQS) for biota for the PBDEs and about 75% were higher than the EQS specific to PFOS. Finally, 20% of the analyzed eels presented TEQ concentrations above the maximum limits for lipid-rich species. These results supplied new data on the occurrence, levels, and patterns of 53 organic chemicals in the eels from the Loire estuary and they highlighted the need of further investigations focused notably on the potential effects of these chemicals on this species and their analysis in the water and sediments of the estuary.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The anthropization of fresh water systems has led to strong urban, industrial and agricultural pressures. The water systems drain via catchment all the earth surface and thus large rivers are the final receptacle to diffuse pollution including organic compounds. Estuaries are one of the

main zones receiving freshwater runoff before discharging into marine systems.

Persistent organic pollutants (POPs) are chemical substances that persist in the environment, bioaccumulate through the food chain and pose a risk of adverse effects to human health and environment. Numerous POPs were considered as priority pollutants by the Stockholm convention (UNEP, 2009). The present study focused on several of these industrial chemicals of which the monitoring is of high interest. The polychlorinated biphenyls (PCBs) were used for their insulating

* Corresponding author. Tel.: +33 669552298.

E-mail address: mikacouderc@yahoo.fr (M. Couderc).

and flame retardant properties. Despite their ban in the 1970s in most developed countries (1981 in France), they are still measured in environmental samples. The polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of brominated flame retardants (BFRs). They have been widely used in a variety of household and industrial appliances such as textiles, electronic equipment, plastics and furniture (de Wit, 2002). The perfluorinated and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) are largely used as additives for the production of fluoropolymers and as surfactants in industrial and consumer products (Ahrens, 2011). The PFAS were basic components in the production of carpets, textiles, paper and packaging products (Ahrens, 2011). For these two last chemical classes (PBDEs and PFAS), the Water Framework Directive of the European Commission has set environmental quality standards (EQS) in surface waters (river, lake, transitional and coastal) (European Commission, 2008, 2013). The EQS are the concentrations of a pollutant or group of pollutants in water, sediment or biota which should not be exceeded in order to protect human health and environment. Monitoring biota is a new Water Framework Directive requirement.

Other persistent organic contaminants, even if they are not included in the Stockholm Convention, are monitored in the environment. The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a class of various hydrophobic organic molecules which are ubiquitous persistent pollutants of the environment. They have two origins: natural (e.g. forest fires or volcanic activity) and anthropogenic (e.g. pyrogenic or petrogenic). For monitoring PAH exposure of fish, the PAH metabolites (OH-PAHs) are used as markers as the parent compounds are rapidly metabolized (Nagel et al., 2012b). Alkylphenols (APs) such as nonylphenol, octylphenol and butylphenol principally come from the degradation of alkylphenolethoxylates (APEs). These compounds represent a class of non-ionic surfactants widely used as detergent, wetting agents, dispersants, solubilizers, and emulsifiers, e.g. in pesticide formulations and industrial products, including textiles, coating, lube oils and fuels, metals and plastics. In addition to their role of raw material for APEs, APs are used in the preparation of phenolic resins, polymers, heat stabilizers, antioxidants and curing agents (Ying et al., 2002). BisphenolA (BPA) is found ubiquitously in our environment (Vandenberg et al., 2007). This chemical is one of the most widely produced worldwide, with a production volume each year of over 2.7 million tons and it is estimated that every year over 100 tons are released into the atmosphere through production (Vandenberg et al., 2007). BPA is a monomer mainly used in the production of synthetic polymers such as the polycarbonates and the epoxy resins (Flint et al., 2012). All of these compounds (PCBs, PBDEs, PFAS, APs and the PAHs (parent compounds of OH-PAHs)) are listed as priority substances within the European Union Water Framework Directives (European Commission, 2000, 2008, 2013). Since 2013, the list of the directive identified 45 substances or group of substances being of major concern for European Waters (European Commission, 2013). These chemicals were selected from among those presenting a significant risk to or via the aquatic environment.

Chemicals released into the environment may impact ecosystems and human health. This is why it is important to monitor contaminants present in the environment in order to not only safeguard the ecosystems and man, but also target their origin in order to implement rules of restriction or prohibition of these compounds. The Water Framework Directive recommended the use of indicators for monitoring the chemical status of surface waters.

Biological indicators such as crustaceans (Munschy et al., 2013; Ricciardi et al., 2010), bivalves (Covaci et al., 2005) or fish (Bettinetti et al., 2011; Blanchet-Letrouvé et al., 2014; Bodin et al., 2014; Macgregor et al., 2010; Roosens et al., 2010; Schuetze et al., 2010; Tabouret et al., 2011; Tapie et al., 2011) were therefore used most often. Among these potential indicator species, the eel may be used. This bioindicator value is however restricted to the yellow eel phase, because of the reproduction and migratory behavior of the silver eels (Belpaire and Goemans, 2007). The European eel (*Anguilla anguilla*) has specific

physiological and behavioral characteristics (such as catadromous, carnivorous, fat content, wide distribution, euryhalinity and long lifespan) favorable for use as chemical sentinel species (Belpaire and Goemans, 2007). As eel pollution profiles were shown to be significantly different along a river at small and large scales (Belpaire and Goemans, 2007; Belpaire et al., 2008), it would be a valuable fingerprint of the chemical pressure of a specific site, particularly for the lipophilic chemicals. Furthermore since 1950, the eel population has continued to decline even if the glass eel recruitment has increased slightly over the last two years (ICES, 2013). Overfishing, climate change, habitat reduction and numerous hydraulic barriers to the downstream and upstream migrations, impacts of pollution, diseases and parasitism were all factors explaining the overall decline of the stock (Dekker, 2003; Elie and Girard, 2009). In September 2008, the eel was listed as “critically endangered” in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List and one year earlier, it was included in the UN CITES Appendix II list (CITES, 2007). On the other hand, this fish species represents an important part of the human diet (Covaci et al., 2005).

For the European eel, the Loire estuary (France) represents one of the most important continental migration paths of glass eels. The Loire River is one of the largest west European rivers but also the last wild large and most preserved river in Europe. Its estuary constitutes an interesting study area because it is characterized by an important human pressure. Compared with other large French estuaries, few studies on eel contamination by organic compounds exists and they focused mainly on PCBs, dioxins and furans (PCDD/Fs) and PBDEs (Bragigand et al., 2006; Blanchet-Letrouvé et al., 2014; ONEMA, 2012). The aims of the present work were to investigate current levels and profiles of contamination of 53 organic compounds in European eels (*A. anguilla*) collected along the Loire estuary. In order to evaluate variations according to the spatial locations in the estuary and/or life stage, the sample collections were carried out at three locations for yellow eels and at different life stages of the eels (yellow and silver).

2. Material and methods

2.1. Sampling locations

From its source in the Massif Central across the Paris basin before discharging into the Atlantic Ocean, the Loire River flows for more than 1000 km and drains around 118,000 km² catchment area. The Loire estuary is highly urbanized and industrialized, with the Nantes–Saint Nazaire harbor (4th seaport of France), a refinery (2nd in France), a coal power plant, a gas storage, an aircraft industry, a shipyard, etc. and is very attractive for tourism, especially on the coast. Moreover, the estuary constitutes the main source of drinking water for the western region. Agriculture is also an important activity around the estuary. Consequently, it is an area subject to major environmental issues. In the Loire estuary, resources of glass, yellow and silver eels are exploited. For glass, yellow and silver eels, there are about 100, 220 and 3 professional fishermen in the Loire estuary respectively. The annual yields of harvested eels for human consumption are about 3, 30 and 50 tons for glass, yellow and silver eels respectively. Fig. 1 shows the three sampling locations selected in this study. Varades (47°21'58"N–1°1'31"W) is a small city (about 3550 locals), located upstream in the estuary at the limit of the salinity (100 km from the Loire mouth); it presents few industrial activities and is particularly under agricultural pressure. The two other sampling locations are upstream (47°14'15"N–1°28'2"W) and downstream (47°11'39"N–1°40'4"W) an important city, Nantes (about 600,000 locals), called Bellevue and Haute Indre respectively. These two areas are within a strong influence of the North Atlantic Ocean. The city of Nantes, located approximately 50 km from the mouth, is characterized by an industrial harbor and an urban zone including two incineration factories.

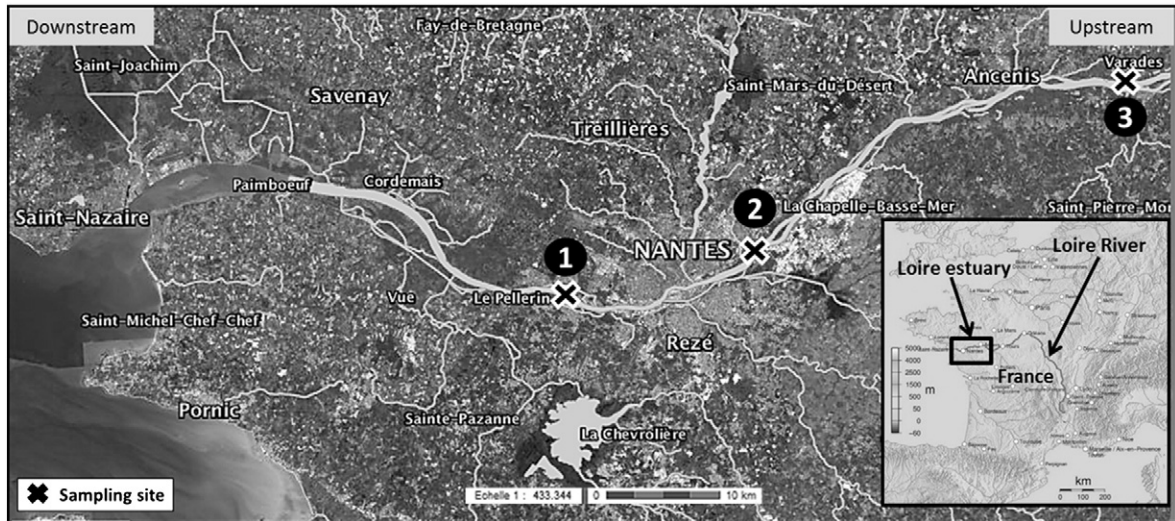


Fig. 1. Map of the France and of the three sampling sites distribution on the Loire estuary. 1: Haute Indre; 2: Bellevue and 3: Varades.

2.2. Studied species and sample collections

According to the fishing authorizations, European eels (*A. anguilla*) were fished by local fishermen in the three sampling areas described above at two life stages (silver (S) and yellow (Y)) in November 2011 and June 2012, respectively (Table 1). Yellow eels were collected with fyke and silver eels with stow nets. The aim is to assess the spatial and life stage influence on chemical accumulation. In function of the sampled fish, only female eels over 40 cm long were kept. The gender was confirmed during dissection. A total of 45 females were randomly collected: 10 yellow eels sampled at Varades (YV), 10 at Bellevue (YB; upstream to Nantes) and 10 at Haute Indre (YHI; downstream to Nantes), as well as 15 migrant silver eels (SV) sampled during downstream migration in the estuary (between Varades and the mouth of the estuary). The silver stage was distinguished from the yellow one using morphological and physiological changes between these two life stages, i.e. body length, ocular diameter, body color (differentiated lateral line and contrasting skin color), pectoral fin length, empty stomach with gut degeneration and gonadal maturation underlined by gonado-

somatic index (GSI) (Durif et al., 2005; Van Ginneken et al., 2007). After fish capture, the eels were conducted to the laboratory in 200 L tanks, aerated and filled with water from the sampling site. At the laboratory, the eels were acclimated during at least 12 h under a natural photoperiod and at a temperature around $12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, equivalent to the fishing site conditions before dissection.

2.3. Biological samples and biometric parameters

Before dissection, the eels were anesthetized in a water bath of 30 L with 4.5 to 6 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%) added, according to their weight. Once anesthetized, biometric parameters of each individual were measured, the total length (TL in cm) and the body weight (BW in g). The animals were then sacrificed by cardiac puncture and dissected on ice ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The verification of gender was realized by direct anatomic observation of gonads. Only female eels were kept for this study. Gonads and liver were weighed to calculate the gonado-somatic index (GSI) ($\text{GSI} = \text{mass of gonads (g)} \times 100/\text{body weight (g)}$) and the hepato-somatic index (HSI) ($\text{HSI} = \text{mass of liver}$

Table 1

Means of biometric parameters (total length (TL), body weight (BW), lipid weight (LW), gonads weight (wt.), liver weight (wt.), parasitic parameters (*Anguillicola crassa* number and weight (wt.)), index (Gonado Somatic Index (GSI), Hepato Somatic Index (HSI), Parasitic Index (PI)) and Fulton's condition factor (K) of European eels sampled in the Loire estuary.

Life stage	Yellow eels		Yellow eels		Yellow eels		Silver eels	
Sampling site	Varades (47°21'58"N–1°1'31"W)		Bellevue (47°14'15"N–1°28'2"W)		Haute Indre (47°11'39"N–1°40'4"W)		Estuary	
Catch period	November 2011		November 2011		November 2011		June 2012	
n	10		10		10		15	
TL (cm)	50.40 ± 5.73	(43.40–64.90)	71.74 ± 11.35	(52.20–87.20)	52.22 ± 7.04	(42.30–63.00)	61.80 ± 9.99	(50.30–83.50)
BW (g)	192.30 ± 96.41	(114.00–459.00)	727.50 ± 409.24	(262.00–1685.00)	222.20 ± 93.59	(123.00–359.00)	384.20 ± 247.62	(181.00–992.00)
LW (%)	6.16 ± 4.96	(0.70–15.16)	17.65 ± 11.05	(2.26–35.03)	13.32 ± 12.52	(0.64–34.77)	26.86 ± 4.36	(18.81–34.77)
<i>Anguillicola crassa</i> number	4.30 ± 7.73	(0.00–21.00)	2.40 ± 2.07	(0.00–6.00)	6.10 ± 9.95	(0.00–33.00)	2.47 ± 3.66	(0.00–14.00)
<i>Anguillicola crassa</i> wt. (g)	0.44 ± 0.60	(0.00–1.54)	2.61 ± 2.75	(0.00–9.16)	2.48 ± 3.12	(0.00–10.49)	0.22 ± 0.46	(0.00–1.54)
Gonads wt. (g)	0.62 ± 0.78	(0.15–2.81)	5.68 ± 6.22	(0.76–20.42)	1.46 ± 1.73	(0.14–5.57)	7.09 ± 4.05	(3.21–16.50)
Liver wt. (g)	2.20 ± 1.01	(1.44–4.86)	7.00 ± 3.33	(3.19–15.01)	2.76 ± 1.28	(1.34–4.58)	4.51 ± 2.73	(2.41–11.41)
GSI (%)	0.27 ± 0.15	(0.13–0.61)	0.66 ± 0.41	(0.29–1.53)	0.55 ± 0.48	(0.11–1.62)	1.89 ± 0.14	(1.66–2.21)
HSI (%)	1.16 ± 0.20	(0.83–1.43)	1.01 ± 0.14	(0.79–1.22)	1.22 ± 0.17	(1.08–1.61)	1.20 ± 0.15	(0.97–1.53)
PI (%)	0.25 ± 0.35	(0.00–0.90)	0.33 ± 0.22	(0.00–0.58)	1.01 ± 1.04	(0.00–3.23)	0.06 ± 0.13	(0.00–0.39)
K	0.14 ± 0.02	(0.12–0.18)	0.18 ± 0.03	(0.15–0.25)	0.15 ± 0.02	(0.12–0.18)	0.15 ± 0.01	(0.13–0.17)

(Mean ± standard deviation).

(g) $\times$ 100/body weight (g)) respectively. The GSI allowed the evaluation of developmental stage of eels; GSI values higher than 1.2 underlined the gonad maturation occurring during silvering (Durif et al., 2009). The HSI provided an indication on status of energy reserves in the liver. Biometric parameters recorded were used to calculate the Fulton condition index ($K = (BW \times 10^5) / TL^3$) which allowed the evaluation of overall global eel health. A reduction of this index has been considered, in fish, to be related to poor habitat quality, lower availability of food, changes in feeding habits and a metabolic rate increase in response to pollution and/or other environmental stresses (Hoque et al., 1998; Lloret et al., 2002).

The whole muscle (two filets) was also collected and then stored at -20°C until chemical analysis. The bile was sampled by puncture in the gallbladder and stored at -20°C . The swim bladder of each eel was removed and dissected to detect the presence of parasites. In case of infection, the number and weight of parasites present in the swim bladder were determined to calculate the percentage of individuals infected and the parasite index (PI) ($PI = \text{parasite total weight (g)} / \text{body weight (g)}$) to evaluate the infection level (Quadroni et al., 2013).

2.4. Fish muscle analysis

2.4.1. PCB and PBDE analysis

2.4.1.1. Chemicals and reagents. Eel muscles were analyzed for 18 PCBs and 7 PBDEs. Among the PCBs, 12 were dioxin-like PCBs (dl-PCBs: #77; 81; 105; 114; 118; 123; 126; 156; 157; 167; 169; 189) and 6 were non-dioxin-like PCBs (ndl-PCBs: #28; 52; 101; 138; 153; 180; also called PCB indicators (PCBi)). Seven PBDE congeners were monitored, i.e. BDEs 28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183. PBDE 209 was not analyzed because it required a specific analytical procedure not developed in the laboratory. Targeted compounds including native and ^{13}C -labeled internal standards were obtained from Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada) and Cambridge Isotope Laboratories (Andover, CA, USA). All solvents (Picograde® quality) were purchased from Promochem (Wesel, Germany).

2.4.1.2. Sample preparation procedure. For PCB/PBDE analysis, eel muscles were homogenized, weighed and freeze-dried. The freeze-dried muscles were cut and milled using a turbo-mixer. Before use, all glassware was cleaned and heated overnight in a muffle furnace at 550°C and disposable materials were used for each experiment. Sample preparation was carried out in an over pressurized room to prevent contamination, especially for PBDEs. One gram (dw) of powdered sample was transferred into a cell and then extracted by accelerated solvent extraction (ASE) using a Dionex ASE 300. Before extraction, ^{13}C -labeled PCBs and PBDEs (respectively 18 and 7) congeners were added to the sample for internal standard calibration and quantification by the isotope dilution method. The extraction temperature and pressure were set to 120°C and 100 bars respectively. The extraction solvent was a toluene/acetone (70:30, v/v) mixture. Three successive extraction cycles, of 5 min each, were performed. The muscle lipid weight (LW in % of wet weight) was determined by gravimetry. The fat extract was dissolved in 25 mL hexane before further sample clean-up. Three steps of purification were achieved, using successively acid silica, Florisil® and celite/carbon columns. The fat was removed on the first silica gel column activated with sulfuric acid. PCBs and PBDEs were purified on the second Florisil® column. The separation of coplanar (non-ortho) PCBs from non-planar PCBs and PBDEs was performed on an activated mixture of Florisil®/Carbopack C/Celite 545 (overnight at 130°C). Before evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen, injection standards ($^{13}\text{C}_{12}$ -PCB #111 for PCBs, $^{13}\text{C}_{12}$ -PBDE #139 for PBDEs) were added to the final purified extracts for signal correction. Eventually, the extracts were reconstituted in 20 and 50 μL toluene for coplanar PCBs and non-coplanar PCBs with PBDEs, respectively.

2.4.1.3. GC–HRMS measurement. PCB and PBDE analyses were carried out by gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (GC–HRMS) using an 7890A gas chromatograph (Agilent) coupled with a JEOL JMS 700D or a JMS 800D double sector high resolution mass spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan). The system was fitted with a DB5MS (J&W) capillary column ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) and injection was done in the splitless mode. Helium was used as a carrier gas (1 mL/min). The injection volume was 2 μL . The GC program for PCBs was: 3 min at 120°C , $20^\circ\text{C}/\text{min}$ to 170°C , $3^\circ\text{C}/\text{min}$ to 245°C and $20^\circ\text{C}/\text{min}$ to 275°C . For the PBDEs, the program used was: 2 min at 120°C , $10^\circ\text{C}/\text{min}$ to 215°C , $3^\circ\text{C}/\text{min}$ to 270°C , $10^\circ\text{C}/\text{min}$ to 310°C and held for 4 min. The source temperature was 280°C . The mass spectrometer resolution was set-up at 10,000 (FWHM) and the spectrometric signals were recorded in the Single Ion Monitoring (SIM) mode focusing on two abundant ions selected in the molecular ion isotopic pattern. Ionization was achieved in the electron ionization mode (40 eV electron energy). Signals obtained were integrated by JEOL Diok software (v.4). The limit of detection (LOD) was determined by a signal to noise ratio equal to 3 ($S/N = 3$) and was systematically calculated by JEOL Diok software for each congener in each sample. The concentrations of PCBs and PBDEs were expressed as ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (LW). For PCBs, the LOD ranged from 0.16 (PCB 169) to 1.72 (PCB 156) pg/g ww for dl-PCBs and from 0.67 (PCB 101) to 13.4 (PCB 28) pg/g ww for PCBi. For PBDEs, the LOD ranged from 1 (BDE 28) to 5 (BDE 183) pg/g ww. The recoveries ranged from 60 to 120%.

2.4.2. Toxic equivalency calculation

Health risk resulting from PCB toxicity was estimated by the Toxic Equivalent (TEQ) values. Concentrations of TEQs were calculated by summing the concentration of each congener weighed by a specific congener factor, the World Health Organization Toxic Equivalent Factors (WHO TEFs) for human. For comparative purposes with literature, our TEQ data have been expressed in WHO TEQ 1998 and WHO TEQ 2005 (Van den Berg et al., 1998, 2006). In addition, dl-PCBs TEQ and Total TEQ were estimated by predictive models using the indicator PCBs (Babut et al., 2009; Bodin et al., 2014).

2.4.3. PFAS analysis

2.4.3.1. Chemicals and reagents. PFAS and corresponding ^{13}C -labeled internal standards (purity higher than 98%) were obtained from Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada). A total of 17 PFAS were analyzed in the eel muscles including 5 perfluoroalkylsulfonates (PFASs): perfluorobutanesulfonate (PFBS), perfluorohexanesulfonate (PFHxS), perfluoroheptanesulfonate (PFHpS), perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorodecanesulfonate (PFDS); 1 perfluoroalkylsulfinate (PFASi): perfluorooctanesulfinate (PFOSi) and 11 perfluorocarboxylic acids (PFCAs): perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPA), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluoroundecanoic acid (PFUnA), perfluorododecanoic acid (PFDoA), perfluorotridecanoic acid (PFTTrDA) and perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA). Ten labeled internal standards were used i.e. PFBA $^{13}\text{C}_4$, PFHxA $^{13}\text{C}_5$, PFHpA $^{13}\text{C}_4$, PFOA $^{13}\text{C}_4$, PFNA $^{13}\text{C}_2$, PFDA $^{13}\text{C}_2$, PFUnA $^{13}\text{C}_7$, PFDoA $^{13}\text{C}_2$, PFOS $^{13}\text{C}_4$ and PFOSi $^{13}\text{C}_4$. Methanol (Picograde® quality) was purchased from Promochem (Wesel, Germany). Ammoniac (32%), ammonium acetate, potassium hydroxide and glacial acetic acid were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). The SPE WAX cartridges (150 mg, 6 mL) were purchased from Waters (Guyancourt, France) and the Envicarb cartridges (500 mg, 6 mL) from Supelco (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Ultrapure water ($>18\text{ m}\Omega\text{ cm}$) was produced with a nanopure system (Barnstead, Germany).

2.4.3.2. Sample preparation procedure. One gram of freeze-dried eel muscle was introduced into a polypropylene tube of 50 mL and 2 ng of an internal standards mixture (10^{13} C-mass labeled compounds) was added. The tube was agitated. Then, a liquid solid extraction (LSE) was performed by adding 15 mL 0.01 M KOH of methanol before mechanical agitation during 15 min. The mixture was left overnight at room temperature. After extraction, 3 mL supernatant was transferred in a polypropylene tube and evaporated to 1 mL under a gentle nitrogen stream. 4 mL water was added to the supernatant before purification using solid phase extraction with WAX stationary phase. The cartridge was previously conditioned with 4 mL MeOH/NH₄OH (99.5:0.5, v/v), followed by 4 mL MeOH and 4 mL water. The extract was loaded on the cartridge and washed twice: first 4 mL ammonium acetate (20 mM) and then 4 mL MeOH. The elution was performed with 4 mL MeOH/NH₄OH (99.5:0.5, v/v). The eluted solution was evaporated to 1 mL under a gentle stream of nitrogen. Then, a second SPE composed of carbon graphitized (Envicarb) was conditioned with 10 mL MeOH. The extract was loaded on the cartridge and the target compounds were eluted with 6 mL MeOH/glacial acetic acid (80:1, v/v). After evaporation under a gentle stream of nitrogen, the extract was reconstituted with 160 μ L water and 100 μ L of a recovery standard PFOS 13 C8 (0.01 ng/ μ L).

2.4.3.3. LC–MS/MS measurement. The purified extract was analyzed using liquid chromatography (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with tandem mass spectrometry. The separation of compounds was achieved using a Gemini C18 reverse phase column (3 μ m, 50 $\times$ 2.0 mm) (Phenomenex, Torrance CA, USA). Elution solvents were MeOH 100% (A) and ammonium acetate in water (0.02 M) (B). The flow rate was 0.6 mL/min. The elution gradient was: t = 0–2 min: 30% A, t = 7–11 min: 100% A, t = 15–20 min: 30% A. The MS instrument used for detection and quantification was a triple quadrupole Agilent 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The electrospray ionization was used in the negative mode. A minimum of two transitions were recorded per analyte. Mass spectra were acquired in the SRM mode. The common optimized source parameters were: capillary voltage, –3 kV; desolvation gas flow rate, 10 L/min; desolvation temperature was set at 300 °C; nebulization gas pressure at 45 psi and source temperature at 250 °C. The fragmentor voltage and collision energy were optimized for each monitored PFAS. Signals were treated by Agilent MassHunter Workstation Software and concentrations of PFAS are reported as ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (LW). The LOQ value was determined for each target compound in each analyzed sample. LOQ values were between 0.006 ng/g ww (PFOA) and 1.259 ng/g ww (PFBA) for each PFAS. The recoveries ranged from 65 to 125%.

2.4.4. Quality assurance/quality control

PCB, PBDE and PFAS concentrations were determined at LABERCA, the French National Reference Laboratory in charge inter alia of POPs in food and feed. All procedures were integrated in a certified quality assurance system ISO/IEC 17025:2005. A blank control and fish oil as internal quality control were included in each series of analysis. Results of this quality control sample were plotted in control charts to check a deviation. The compounds were quantified by isotopic dilution using the corresponding 13 C-labeled isomers and internal standard method was used to quantify samples. The PCB procedure integrated quality control parameters to fulfill the requirements of Commission Directives 2002/69/EC and 2005/7/EC laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of dl-PCBs in foodstuffs and feeding stuffs respectively. The laboratory applied the same requirements for PBDE analysis. The analytical method for PFAS was validated according to Commission Decision 2002/657/EC and 2004/25/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Furthermore, for each family of contaminants,

LABERCA successfully participates in international proficiency tests in food (Norwegian Institute of Public Health and Amsterdam University).

2.5. OH-PAH, AP and BPA analysis in fish bile

2.5.1. Chemicals and reagents

BPA, 5 OH-PAHs (2-naphthol (2-OHNa); 2-hydroxyfluorene (2-OHF); 1-phenanthrenol (1-OHPhe); 9-phenanthrenol (9-OHPhe); 1-hydroxypyrene (1-OHPyr)), 4 APs (4-tert-butylphenol (4-t-BP); 4-tert-octylphenol (4-t-OP); 4-octylphenol (4-OP); 4-n-nonylphenol (4-n-NP) (CAS #104-40-5), and a mixture of 4-p-nonylphenol (4-p-NP) (CAS #84852-15-3)) were purchased from Sigma Aldrich (France) as well as sodium acetate, ascorbic acid and β -glucuronidase with 1% sulfatase activity (Type H-3 from *Helix pomatia*). Ethanol (absolute) and acetonitrile (Scharlau LC–MS grade) were obtained from Interchim (France). To perform the analysis of total biliary proteins, sodium chloride, Trizma base and Bio-Rad Protein Assay were respectively purchased from Merck, Sigma-Aldrich (France) and Bio-Rad (France).

2.5.2. Sample preparation procedure

Conjugated metabolites of bile were analyzed according to modified methods from Kammann (2007) and Jonsson et al. (2008). Twenty-five μ L of fish bile were incubated at 40 °C overnight in the presence of 100 μ L of sodium acetate buffer (pH 5) and 25 μ L of β -glucuronidase sulfatase (100 units β -glucuronidase and 5 units sulfatase/ μ L bile). After incubation, 100 μ L of an ascorbic acid solution in ethanol (5 mg/L) were added and the mixture was vortexed for 1 min. A centrifugation was performed at 4 °C, 10,000 G during 10 min and the supernatant was removed and injected in the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system.

2.5.3. HPLC–FL measurements

The HPLC system was an LC Ultimate 3000 (Dionex – Thermo Scientific) equipped with a quaternary pump (DGP-3600RS), a thermally controlled auto-sampler (fixed at 4 °C) (WPS-300TSL), a column oven (TCC-3000SD) and a programmable fluorescence detector (FLD-3400RS, Dionex –Thermo Scientific). Chromatographic separation was performed on a reverse phase C18 column (5 μ m, 250 mm $\times$ 3.0 mm; Supelcosil LC-PAH, Supelco, Sigma Aldrich) protected by a guard column (Supelgard LC-18, Supelco, Sigma-Aldrich) and maintained at 50 °C. Aliquots of 10 μ L were injected and the flow rate was set at 1 mL/min. The mobile phase consisted of water (A): acetonitrile (B) with the following linear gradient: t = 0–5 min: 60% A; t = 15 min: 20% A; t = 20–23 min: 100% A; and t = 25–35 min: 60% A. Before analysis, the lambda max of excitation and emission of each targeted compound was determined using a 3D spectrofluorimeter (Perkin Elmer) and optimized with the fluorescence detector of the HPLC system used for the measurements (3D synchronous data acquisition). The excitation/emission wavelengths during the chromatographic run were: 225/313 nm for BPA and APs; 245/380 nm for 9-OHPhe, 1-OHPhe and 1-OHPyr; 271/334 nm for 2-OHF; 226/354 nm for 2-OHNa. The fluorescence detector allowed an analysis using simultaneously 4 channels. Data were acquired and processed using the Chromeleon 7 software (Thermo Scientific). The contaminant quantification was performed by an external calibration using multilevel calibration curves (at least 6 concentrations) from a mixture of APs (linear range: LOQ–150 ng/mL), BPA (linear range: LOQ–150 ng/mL) and PAH metabolites (linear range: LOQ–200 ng/mL).

2.5.4. Recovery and limit of detection

Concentrations of AP, BPA and PAH metabolites were determined at MMS laboratory of Nantes University. The sample preparation procedure was validated using spiked samples. The recoveries of APs, BPA and PAH metabolites (OH-PAHs) were calculated before and after extraction to evaluate extraction efficiency and matrix effects. A spike solution containing all compounds at a concentration of 100 ng/mL in

acetonitrile was added to fish bile randomly chosen. The spiked bile was treated as a sample. A blank sample (bile without spike solution) was also analyzed to determine background levels. These procedures were repeated three times. Recoveries obtained were: 92.4% for the BPA, 89.6% for the 4-t-BP, 89.0% for the 4-t-OP, 80.9% for the 4-OP, 79.9% for the 4-NP, 84.3% for the 2-OHNa, 79.2% for the 2-OHF, 85.9% for the 1-OHPhe, 47.6% for the 9-OHPhe and 89.0% for the 1-OHPyr.

The limits of detection and quantification (LOQs) were determined for each compound following the method described by Vial and Jardy (1999). The LOD values were: 0.25 ng/mL for the BPA, 0.18 ng/mL for the 4-t-BP, 0.41 ng/mL for the 4-t-OP, 0.003 ng/mL for the 4-OP, 0.46 ng/mL for the 4-NP, 0.017 ng/mL for the 2-OHNa, 0.033 ng/mL for the 2-OHF, 0.039 ng/mL for the 1-OHPhe, 0.48 ng/mL for the 9-OHPhe and 4.03 ng/mL for the 1-OHPyr.

Contents of APs, BPA and PAH metabolites were normalized by the measure of total biliary proteins and expressed as µg per g of protein. This normalization permitted the compensation of the differences of water content in the bile and the differences due to the feeding status of fish (Ruddock et al., 2003). The biliary protein content was measured by visible-spectrometry (UV-visible spectrophotometer Helios Omega – Thermo Scientific) using bovine γ-globulin as standard protein (Bio-Rad Protein Assay) following the method of Bradford (Bradford, 1976).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using Statistica software (v 7, StatSoft, Inc.). The conditions for applying parametric tests, i.e. homogeneity of variance and normality, were verified using Bartlett and Shapiro–Wilk tests respectively. As result of these tests, non-parametric tests (Kruskal–Wallis ANOVA (KW)) were used in order to highlight significant differences of contaminant levels in the muscle and bile of eels from different locations and life stages. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of p-value (MCP) when it was significant at $p < 0.05$. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. Links between variables were analyzed using the Pearson's correlation. As an integrated approach, Principal Component Analysis (PCA) was performed to illustrate and facilitate the discrimination of contaminant levels in the muscle and bile of eels from different sites and life stages, as well as their biometric parameters.

3. Results and discussion

3.1. Biometric parameters

The biometric parameters (Table 1) were presented according to the life stage (yellow or silver) of organisms and the fishing locations along the Loire estuary (Varades, Bellevue and Haute Indre). Four groups were considered: yellow eels from Varades (YV), from Bellevue (YB), from Haute Indre (YHI) and silver eels (SV). Total length mean was significantly greater for the YB group compared with YHI and YV ($p = 0.002$ and $p < 0.001$ respectively) but not significantly different to SV ($p = 0.524$). The lowest mean size was observed for YV which was very close to the YHI group. YHI and SV constituted intermediate groups. Nonetheless, SV had a greater mean size than YHI. Body weight differences between groups were similar to those found for the total length and showed the same significant differences. Whatever the life stage and the fishing location, BW was positively correlated to TL ($p < 0.001$). The linear regression equations were $TL = 0.056BW + 39.62$ $R^2 = 0.887$ for YV, $TL = 0.071BW + 36.64$ $R^2 = 0.901$ for YHI, $TL = 0.024BW + 54.10$ $R^2 = 0.764$ for YB and $TL = 0.039BW + 46.71$ $R^2 = 0.946$ for SV. These results are in accordance with a previous study on eels (*A. anguilla*) from the Loire estuary (Blanchet-Letrouvé et al., 2014). The three groups of yellow eels had a lower LW than silver eels but this difference was significant only for YV and YHI eels ($p < 0.001$ and $p = 0.040$,

respectively). These LW values were usually observed in silver European eels (Quadroni et al., 2013). Previous studies showed that yellow eels have lower lipid content mainly due to their growth whereas silver eels are in life development and accumulating lipid reserves for migration (Durif et al., 2005). According to Boëtius and Boëtius (1980), the percentage of lipids necessary to support the energetic cost of gamete production and migration must be at least 20% of the body weight. Only one SV eel had a lipid weight lower than this value ($LW = 18.8\%$). All other silver eels had a lipid content ranging from 22.2% to 34.8%. Two more recent studies (Van den Thillart et al. (2004); Palstra et al. (2007)) established at 15% and 13.5% of the body weight, respectively, the lipid content necessary to realize the healthy migration to the Sargasso Sea. In the present study, it can be assumed the silver eels had sufficient lipid energy required for a successful reproductive migration.

The range values of GSI for the SV group were 1.66 to 2.21% reflecting that all individuals of this group were in the silver stage. The GSI values of yellow individuals were significantly lower ($p < 0.008$) and ranged from 0.11 to 1.62%. Only three yellow individuals out of 30 showed GSI values higher than 1.2% which could indicate the onset of silvering. YB and YHI tend to present higher values of GSI compared with YV but the difference was not significant. No sampling site effect was evidenced on the liver weight of yellow eels, HSI values being very variable and ranging from 0.79 to 1.61. YB eels showed significantly lower HSI values compared with SV ($p < 0.05$) but this difference was not found with other yellow eel groups. Durif et al. (2005) described a higher mean HSI value for yellow eels (1.58 ± 0.53) coming from different French waters and sampled between 1994 and 2002.

Silver eels were less infested by *Anguillicola crassa* than the yellow eels as showed by the PI. YHI presented the highest mean of PI among yellow individuals but the variability intra-group was high. The percentages of parasite eels (40%:YV; 66.7%:SV; 80%:YB and YHI) were in accordance with values usually observed in most eels from European habitats (40% up to 90%) (Palstra et al., 2007).

The Fulton's index constituted a biologic factor which could especially characterize the habitat context including pollution pressure and trophic conditions. On the whole, the Fulton's indexes of sampled eels were in the same range than those reported for eels fished in the Loire estuary in 2011 (Blanchet-Letrouvé et al., 2014) and in other European habitats (Bultel et al., 2014; Palstra et al., 2007; Reckordt et al., 2014; Tapie et al., 2011).

3.2. Contaminants in eel muscles

3.2.1. PCBs

The mean concentrations of dl-PCBs and PCBi according to the life stage and location in the estuary are presented in the Table 2. The 18 PCBs investigated were detected in all eels sampled in this study. The mean sum of these 6 PCBi for the yellow eels was 3050.7 ng/g LW. This concentration was lower than those measured in Flemish eels (Belpaire et al., 2011; Van Ael et al., 2014). In order to compare these results with previous studies, the PCB 118 was added to this sum. For yellow eels, the mean sum of the 6 PCBi + PCB-118 was twice lower (3326.9 ng/g LW) than the concentrations measured in the Rhin and Meuse (5724–8518 ng/g LW) by de Boer et al. (2010) and in Flanders (4636 ng/g LW) by Van Ael et al. (2014). However, this value was greater than levels reported in Italia (Tevere river: 685.3 ng/g LW Bettinetti et al. (2011)), in France (the Gironde estuary: 2062 ng/g LW, (Bodin et al., 2014), and in the Adour basin: 193–1320 ng/g LW (Tabouret et al., 2011)). However, Tapie et al. (2011) found, in eels with the same size class, close concentrations in the Gironde estuary (1913–4473 ng/g LW), the Garonne river (1372–3478 ng/g LW) and the Dordogne river (1321–2992 ng/g LW). PCB eel contaminations were previously investigated in the Loire estuary by Blanchet-Letrouvé et al. (2014). Two sites were directly comparable with this study because of their proximity (Varades and Nantes/Belevue). The results

Table 2
Mean concentrations of dl-PCBs, ndl-PCBs (PCBi), PCBs (dl-PCBs + ndl-PCBs), PBDEs and PFAS in eel muscles and concentrations of BPA, APs and OH-PAHs in eel biles from Loire estuary according to the sampling site (Varades, Bellevue, Haute Indre) and the life stage (yellow and silver). Muscle concentrations are expressed in ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (LW) and bile concentrations are expressed in ng/mL bile and µg/g protein (prot.).

Life stage		Yellow eels		Yellow eels		Yellow eels		Silver eels	
Sampling site		Varades		Bellevue		Haute Indre		Estuary	
n		10		10		10		15	
Muscle concentration	dl-PCB sum (ng/g ww)	10.9 ± 5.1	(4.6–21.3)	51.1 ± 25.0	(7.5–85.1)	38.8 ± 26.5	(7.9–89.7)	34.8 ± 7.0	(26.2–48.5)
	dl-PCB sum (ng/g dw)	38.6 ± 14.2	(21.0–61.1)	143.8 ± 71.3	(16.1–277.4)	105.4 ± 50.3	(34.5–201.9)	78.9 ± 16.7	(60.2–106.4)
	dl-PCB sum (ng/g LW)	343.7 ± 350.4	(88.0–1156.1)	566.7 ± 701.4	(25.3–2418.4)	506.9 ± 374.0	(176.4–1225.3)	132.8 ± 33.9	(89.1–208.0)
	ndl-PCB sum (ng/ ww)	63.4 ± 28.2	(29.1–125.2)	329.4 ± 207.7	(22.5–746.2)	256.2 ± 170.2	(69.3–635.8)	190.0 ± 34.7	(144.1–253.5)
	ndl-PCB sum (ng/g dw)	223.6 ± 70.0	(131.7–359.4)	916.9 ± 538.3	(48.5–2005.4)	717.0 ± 342.0	(304.1–1430.9)	430.8 ± 86.9	(345.3–607.3)
	ndl PCB sum (ng/g LW)	1945.3 ± 1922.2	(587.5–6659.9)	3355.7 ± 3583.9	(76.1–12270.2)	3851.2 ± 3367.2	(782.4–10795.5)	724.6 ± 180.7	(533.2–1078.5)
	PCB sum (ng/g ww)	74.3 ± 33.2	(33.8–146.5)	380.5 ± 230.3	(30.0–821.5)	294.9 ± 195.7	(77.2–725.5)	224.8 ± 41.2	(172.2–302.0)
	PCB sum (ng/g dw)	262.2 ± 83.9	(152.7–420.6)	1060.7 ± 600.7	(64.6–2207.7)	822.4 ± 389.8	(338.6–1632.8)	509.8 ± 102.5	(413.6–702.7)
	PCB sum (ng/g LW)	2288.9 ± 2270.8	(675.5–7816.1)	3922.5 ± 4276.4	(101.5–14688.6)	4358.1 ± 3740.2	(958.8–12020.8)	857.4 ± 213.1	(622.3–1286.5)
	PBDE sum (ng/g ww)	0.6 ± 0.5	(0.1–1.9)	4.9 ± 3.1	(1.8–10.9)	4.2 ± 3.2	(0.7–8.8)	9.5 ± 2.9	(6.7–18.1)
	PBDE sum (ng/g dw)	2.2 ± 2.3	(0.4–8.1)	12.9 ± 6.1	(6.4–25.0)	10.9 ± 6.0	(2.9–18.0)	21.6 ± 6.4	(15.4–39.9)
	PBDE sum (ng/g LW)	25.9 ± 42.1	(2.3–107.2)	40.5 ± 29.7	(10.0–102.9)	46.2 ± 29.2	(24.1–103.6)	36.3 ± 12.0	(21.8–70.0)
	PBDE 47 (ng/g ww)	0.3 ± 0.3	(0.0–1.1)	3.0 ± 2.0	(0.9–6.7)	2.4 ± 2.1	(0.2–5.6)	6.5 ± 2.3	(4.2–13.5)
	PBDE 47 (ng/g dw)	1.2 ± 1.3	(0.2–4.6)	7.8 ± 4.0	(3.7–15.3)	6.1 ± 4.0	(0.9–11.4)	14.6 ± 5.0	(10.1–29.7)
	PBDE 47 (ng/g LW)	13.1 ± 20.7	(1.3–60.6)	22.4 ± 12.7	(7.5–47.4)	21.6 ± 8.3	(10.1–36.0)	24.6 ± 9.3	(14.4–52.0)
	PFAS sum (ng/g ww)	22.5 ± 16.0	(5.1–47.8)	45.2 ± 44.1	(7.7–149.3)	20.0 ± 16.9	(4.1–50.4)	32.5 ± 23.4	(5.1–84.0)
	PFAS sum (ng/g dw)	88.4 ± 71.9	(16.4–212.7)	123.7 ± 104.6	(16.5–342.1)	75.3 ± 76.2	(8.7–221.0)	75.4 ± 57.6	(12.0–210.0)
	PFAS sum (ng/g LW)	1293.0 ± 2090.3	(50.5–6656.8)	398.5 ± 384.1	(26.0–1256.2)	1177.8 ± 2434.9	(12.4–7845.9)	129.9 ± 104.2	(18.7–370.5)
n		6		8		6		6	
Bile concentration	BPA (ng/mL)	3109.1 ± 1706.5	(1715.5–7012.4)	412.7 ± 705.2	(15.5–2321.2)	<LOD	–	36.8 ± 34.2	(18.6–125.9)
	BPA (µg/g prot.)	1212.9 ± 1278.7	(147.0–3641.5)	127.5 ± 184.0	(8.4–564.9)	<LOD	–	5.2 ± 5.2	(1.7–15.6)
	AP sum (ng/mL)	189.0 ± 107.1	(46.8–349.3)	141.0 ± 114.7	(35.3–358.1)	617.8 ± 237.8	(141.8–842.7)	160.8 ± 232.9	(0.0–569.2)
	AP sum (µg/g prot.)	59.3 ± 39.5	(16.6–125.1)	64.2 ± 51.9	(21.4–170.0)	285.5 ± 226.1	(33.3–575.6)	30.7 ± 30.6	(4.4–70.4)
	OH-PAH sum (ng/mL)	74.5 ± 44.3	(35.0–167.5)	23.9 ± 20.4	(0.5–53.7)	32.6 ± 11.7	(15.9–50.8)	148.8 ± 68.1	(0.0–259.4)
	OH-PAH sum (µg/g prot.)	26.0 ± 16.4	(3.7–43.7)	8.6 ± 10.0	(0.3–25.5)	14.9 ± 10.7	(4.6–32.8)	21.7 ± 6.3	(12.9–32.1)

Mean ± standard deviation; min–max value are presented into brackets.

were similar for the yellow eels from these sites as well as those of silver eels. The downstream site in this study (Haute Indre) was further away than the Cordemais site, leading to differences of eel contaminations. YHI eels seemed to be more contaminated than eels from the Cordemais site because the Haute Indre site is closer to Nantes city. The results of the present study showed intermediate contamination of yellow eels from the Loire estuary compared with other French rivers. Silver eels were less contaminated (sum of the 6 PCB_i and 6 PCB_i + PCB-118, 725 and 799 ng/g respectively) compared with the whole of the yellow ones, regardless of the sampling site. Regarding the influence of the fishing zone in the Loire estuary, the yellow eels from Varades (YV) were significantly ($p < 0.027$) less contaminated in ndl-PCBs and dl-PCBs expressed as ng/g ww and dw than the ones from the two other sites (YHI, YB). No differences were found between the YB and YHI. These results could be explained by the influence of the sampling site and the LW of eels. The Varades site is far from industrial and urban influences compared with the other sampling sites (Bellevue, Haute Indre). On the other hand, assuming that PCBs are lipophilic compounds, their levels are usually correlated to LW. In the present study, PCB levels (expressed in ww) were correlated to the LW only for YV and YHI groups ($p < 0.05$). The differences observed in PCB accumulation could be partially linked to lower LW depicted mainly for YV and to a lesser extent for YHI. Normalization of the PCB concentrations by eel lipid contents was more relevant for the comparison between the sampling sites, since other factors like the size and physiological condition also affected the overall bioaccumulation. This lipid normalization leads to similar levels whatever the sampling site, indicating that the contamination level in Varades was comparable with those in Bellevue and Haute Indre. However, the high variability of PCB concentrations in the different groups must be duly noted. This variability could be due to the fact that in estuarine habitats, furthermore in estuarine tidal systems, the sedentarity is less pronounced than in freshwater upstream habitats.

An influence of the life stage is only observable between YV and SV which was more contaminated ($p < 0.038$; for dl-PCB, PCB_i and PCB sum in ww and dw). When concentrations of ndl-PCBs, PCB_i and total sum PCBs were normalized by gram of lipids in muscle, YV levels were similar to SV and significantly ($p < 0.005$) lower than YB and YHI. These results could be explained by the fact that migrating silver eels could come from less polluted freshwater areas, far upstream,

since the Loire River is characterized by the absence of barriers permitting the free downstream–upstream migration of fish. Furthermore, [Daverat et al. \(2004\)](#) reported that eels would not be strictly sedentary fish. Moreover, lipophilic compounds like PCBs have the particularity of accumulating in fat muscle. Another hypothesis could be that the mobilization of lipid reserves would induce a detoxification process of the muscles of silver eels. In fact, silver eels during migration mobilized lipid reserves providing the necessary energy for sexual maturation and also for crossing the Atlantic Ocean to reach spawning sites ([Durif et al., 2005](#)). Since the Loire is a large river, a potential migration could start from areas located hundreds of kilometers upstream.

In all sampled eels, dominant congeners among the 18 analyzed PCBs were PCB 153 (39.7%), PCB 138 (23.7%), PCB 180 (14.6%) and PCB 118 (8.4%) such as commonly found in percentages in Europe, e.g. in Flanders ([Van Ael et al., 2014](#)) or Gironde estuary ([Bodin et al., 2014](#)). The 6 PCB_i represented 85.9% of the total PCB concentration in yellow eel muscles and 84.5% in the silver eels. The 6 PCB_i + PCB-118 contributed to 94.2% and 93.3% of the total PCB levels for the yellow and silver eels respectively. According to PCB relative composition in commercial mixtures, this proportional dominance of PCB 153, 138 and 180 could reflect the historic use and subsequent environmental dispersion of Aroclor 1260 ([Belpaire et al., 2011](#); [Frame et al., 2001](#)). The patterns of the 6 PCB_i + PCB-118 according to sampling site and life stage are illustrated in [Fig. 2](#). No differences were found for the PCB congeners 28, 52, 101 and 138 ($p > 0.05$) between the eels of the 3 sampling sites. However, differences were found for the congeners 118, 153 and 180. The proportion of the PCB 153 increased for the eels fished in the downstream part of the river, notably for the YHI eels, which were significantly different than the YV eels ($p < 0.001$). Conversely, the proportion of the PCB 180 decreased in eels fished downstream in the estuary. Indeed, the level was lower in YHI eels than in YV eels ($p = 0.004$). For the PCB 118, the percentage was greater in the muscles of YB eels than in YHI eels ($p = 0.041$) whereas no significant difference was found between YV eels and the two other groups. In this area of the estuary, numerous variations in geochemical processes such as salinity, turbidity, temperature and tidal cycles could affect the bioavailability of contaminants such as PCBs between the different sampling sites ([Blanchet-Letrouvé et al., 2014](#); [Cailleaud et al., 2009](#); [Turner, 2003](#)). The results on PCB 153 and 180 were in accordance

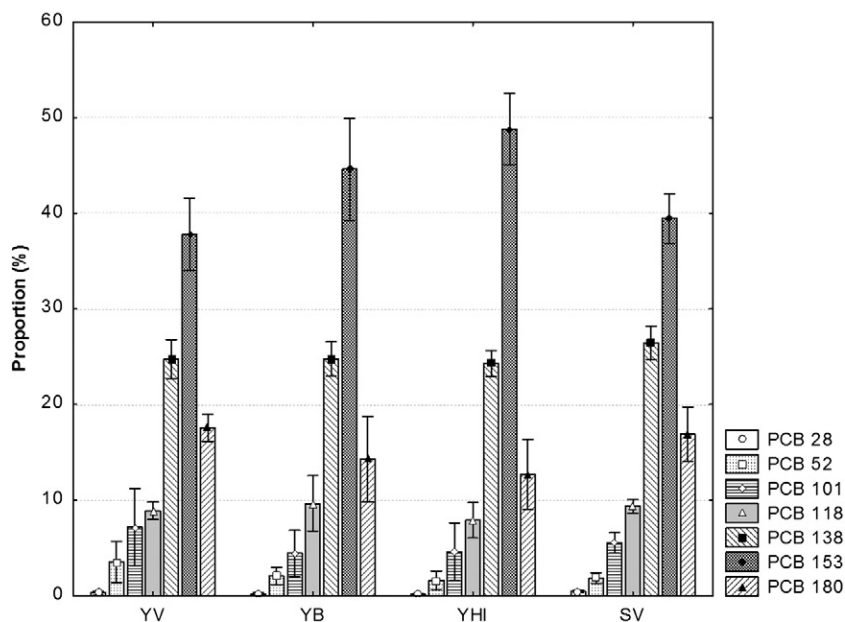


Fig. 2. Profiles of the 6 PCB_i + PCB-118 in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades ($n = 10$); YB: Bellevue ($n = 10$); YHI: Haute Indre ($n = 10$)) and silver eels (SV; $n = 15$). PCB proportions were calculated considering the sum of 6 PCB_i + PCB-118. Error bars correspond to standard deviation. Error bars correspond to standard deviation.

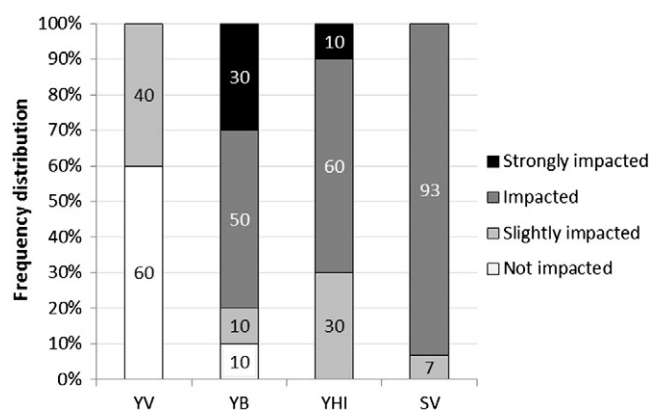


Fig. 3. Eel quality classes distribution in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n = 10); YB: Bellevue (n = 10); YHI: Haute Indre (n = 10)) and silver eels (SV; n = 15) according to 6 PCB_i (ww).

with those of Blanchet-Letrouvé et al. (2014) for Bellevue and Varades sites. The PCB 153 was considered as a non-metabolizable congener, i.e. a tracer of bioaccumulation process. Its higher proportion in YHI eels could suggest differences of diet, ecology, physiology or metabolism capacities, as already proposed by Tapie et al. (2011).

Regarding the influence of the life stage, SV eels presented similar patterns as the YV and YB eels, (except for the congener 28 which was significantly higher for the SV eels ($p = 0.009$)). The SV eels had greater proportions of the congeners 28, 118 and 180 than YHI and a lower proportion of the congener 153. These differences could be explained by the unknown origin of the SV eels. Moreover, the mobilization of the lipids during the silvering process could modify PCB patterns. During starvation, the neutral muscle lipids are more quickly metabolized than the polar ones for energy production (Osako et al., 2003).

According to all the data available for the Loire eels, the existing scoring systems (quality classes; Amilhat et al., 2013; Belpaire and Goemans, 2007; ICES, 2012) were applied to estimate the overall quality of the eels (Fig. 3). The eels were classified as not impacted, slightly impacted, impacted and strongly impacted with PCB_i concentrations in eels <62, 62–155, 155–391, >391 ng/g ww respectively. This figure confirmed the higher contamination of yellow eels from Bellevue and Haute Indre, compared with Varades where more than a half of eels appeared to be not impacted. The silver eels showed less variability than the yellow ones and appeared in the whole as impacted.

3.2.2. PBDEs

PBDE accumulation in the eels is shown in Table 2. Among the 7 investigated PBDEs, 6 were found in all fish. The PBDE 183 was found in all SV but it was detected in 10 to 50% of yellow eels. Burreau et al. (2006) indicated a link between biomagnification and the bromination degree. The PBDEs with up to 6–7 bromine atoms, except congener 183, biomagnify while heavier PBDEs do not. It could partially explain why it was not found in all fish. The presence of this congener in all SV could indicate different exposure windows and sources compared with the yellow eels. The sum of PBDE concentrations ranged from 25.9 to 46.2 ng/g LW in yellow eels and was 36.3 ng/g LW in silver eels. Urbanized sites seemed to be characterized by greater PBDE concentrations than by rural sites as reported by Macgregor et al. (2010) or Roosens et al. (2010). All analyzed eels exceeded the EU EQS biota for the sum of six PBDE congeners (28, 47, 99, 100, 153 and 154): 0.0085 ng/g fish (European Commission, 2008, 2013). The levels of PBDEs varied considerably, ranging from 10 to around 2100 times above the EQS.

The comparisons of monitoring studies are difficult since the number of analyzed PBDE congeners varied. Indeed, there are no PBDE indicators, such as for PCBs, and the regulatory measures of the PBDE

mixture uses tend to stabilize or decrease the contamination levels. This is why, because of its abundance, PBDE 47 is sometimes used to represent PBDE contamination and therefore, it is easier to compare studies using levels of this congener.

In the silver eels from the river Rhine, mean PBDE concentration was 88.7 ng/g LW (PBDE 47 = 59.2 ng/g LW) and in the river Elbe, they were 33.5 ng/g LW and 30.2 ng/g LW for the yellow and silver eels respectively (sum of 9 PBDEs) (22.5 ng/g LW and 21.5 ng/g LW for PBDE 47) (Sühling et al., 2013). Roosens et al. (2010) reported PBDE levels ranging from 10 to 5811 ng/g LW for eels from Flanders (Σ of 10 PBDEs). This high variability was due to a large data set with data from many sites of different typology, area or river basin including healthy sites and sites within proximity of industrialized areas (textile, production of electronic devices and plastic industry). Recently, Malarvannan et al. (2014) presented PBDE values ranging from 12 to 1400 ng/g LW (Σ of 14 PBDEs) in eels from Flanders. Concerning eels from French rivers, Bragigand et al. (2006) found PBDE concentrations in eel muscles ranging from 3.5 to 13.1 ng/g ww in the Seine estuary and from 0.3 to 0.9 ng/g ww in the Loire (Σ of PBDEs) (54 ng/g LW and 1.6 ng/g LW for the PBDE 47). The eels from the Seine estuary were represented by yellow individuals and appeared to be more contaminated than the yellow eels in our study. The levels found in the eels from the Loire were obtained in the muscles of silver eels and were lower in comparison with our data. A study on eels of same size class from the Gironde estuary reported concentrations between 61 and 237 ng/g LW (Tapie et al., 2011). Compared with the PBDE concentrations found in eels from the European waters, the eels from the Loire estuary, like those from the Irish waters (McHugh et al., 2010) and from the French Mediterranean coastal lagoons (Labadie et al., 2010), seemed to be less contaminated. Since there are few companies using PBDEs in the basin of the Loire estuary (Bragigand, 2005), moderate PBDE levels in the Loire should mostly result from the use and incineration of goods commonly consumed in everyday life (Bragigand et al., 2006). Furthermore, penta-BDE and octa-BDE mixtures have been banned in Europe since 2004 and the deca-BDE, the only PBDE mixture authorized, is no longer produced in France or in the European Union (INERIS, 2012), contributing as well to a moderate contamination. Urbanized sites tended to have greater PBDE levels than rural sites as reported for example by Macgregor et al. (2010) or Roosens et al. (2010).

Among the three sites studied in the Loire estuary, YV eels showed PBDE concentrations (expressed in wet and dry weights) significantly lower than the YB and YHI eels ($p < 0.05$). The YHI eels downstream the river showed PBDE levels (expressed in LW) twice greater than YV eels ($p = 0.036$), YB eels being intermediate. PBDE contaminations would be increasing in the direction of the mouth of the estuary. YB and YHI eels located in urbanized and industrialized sites seem to be greater exposed to PBDEs than the YV eels under agricultural pressure.

According to the life stage, silver eels were significantly more contaminated by PBDE compounds than the yellow eels ($p < 0.036$), except for the YB eels. YB eels presented singular physiological characteristics (BS, BW and LW) close to the SV ones which could explain this similarity. After the normalization of concentrations by the lipid content, all differences were annihilated suggesting correlation between PBDE concentration and lipid content. However, PBDE concentrations were significantly correlated with lipid content only for the YHI eels. The absence of correlation between PBDE concentration and LW for the SV eels, as well as for PCB levels, could be explained by the lipid mobilization and by the lack of information on their upstream habitat, which may be less contaminated than the estuary.

PBDE patterns are presented in Fig. 4. Whatever the life stage and location, the most abundant congeners in eel muscles were the PBDE 47 ($59.9 \pm 9.8\%$) followed by the PBDE 100 ($30.7 \pm 11.1\%$) and the PBDE 154 ($5.2 \pm 3.1\%$). PBDE 47 is usually the most abundant congener in fish due to its high uptake rate and to its high bioaccumulation factor (Andersson et al., 1999; Burreau et al., 2006). The high contribution of congener 47 in the patterns may also be due to the enzymatic

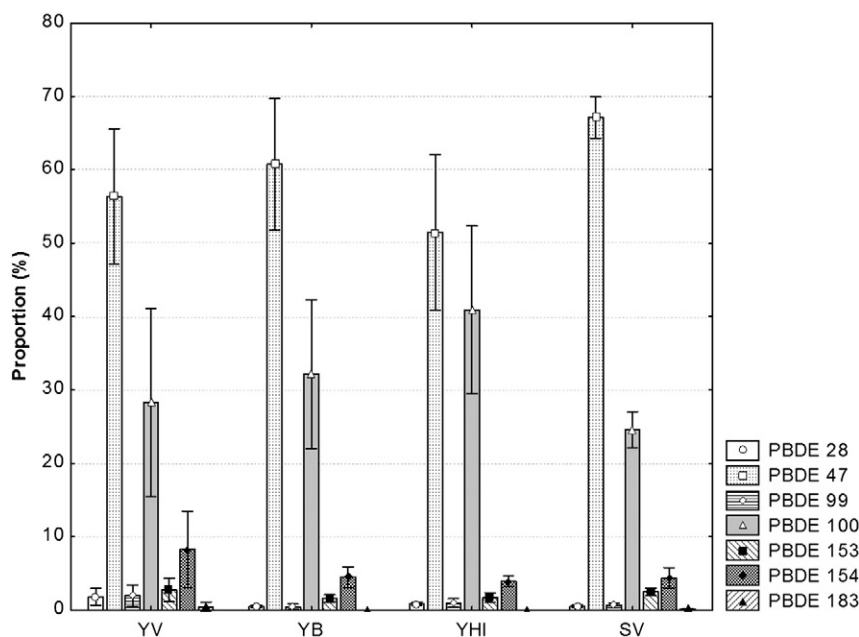


Fig. 4. Profiles of the 7 PBDEs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades ($n = 10$); YB: Bellevue ($n = 10$); YHI: Haute Indre ($n = 10$)) and silver eels (SV; $n = 15$). PBDE proportions were calculated considering the sum of 7 PBDEs. Error bars correspond to standard deviation.

debromination of higher brominated PBDEs in lower brominated ones, like 47, during the metabolism in fish (Eljarrat and Barceló, 2011). For the other PBDE analyzed congeners, the concentrations were low and sometimes below the analytical limit of detection, notably for the congener 183. The low proportion of PBDE 99 could be explained by three hypotheses: i) the nature of source contamination; ii) the low assimilation efficiency (Bureau et al., 1997; Stapleton et al., 2004a, 2004b); iii) the possible biotransformation/metabolism to PBDE 47 in eels as hypothesized by several authors (Labadie et al., 2010; Malarvannan et al., 2014; McHugh et al., 2010; Roosens et al., 2010). Such metabolic pathways have been described in carp (*Cyprinus carpio carpio*) by Stapleton et al. (2004c). Analysis of spatial differences showed no significant differences between sites considering the PBDE 47 as well as the congeners 153, 154 and 183. The congeners 28 and 99 presented a significantly higher percentage in the YV eels than in the YB eels ($p < 0.008$). The YHI eels had a higher proportion of the PBDE 100 than the YV eels ($p < 0.031$).

Regarding life stage, differences were founded for 5 PBDE proportions but without evident coherence. Thus, the congener 28 concentration was lower in the SV eels than in the YV eels ($p < 0.004$). For the PBDE 47, the SV eels had a higher percentage than in YV and YHI eels ($p < 0.013$). The proportion of congener 100 was lower in the SV eels than in the YHI eels ($p < 0.002$). PBDE 153 had a higher proportion in the SV eels than in the YB eels ($p < 0.007$). And PBDE 183 were more represented in the SV eels than in the YB and YHI eels ($p < 0.003$). It must be duly noted that a greater proportion was observed in the pattern of the SV eels for the higher brominated congeners. The PBDE profile of SV eels consisted of PBDE 183 and PBDE 153, which are congeners of the technical octa-BDE mixture. Since August 2004, the penta- and octa-BDE mixtures are banned in Europe due to European scientific assessments (INERIS, 2012). Assuming that the silvering metamorphosis occurs after the juvenile growth and differentiation phase (>7 years for females) in the inland waters (Van Ginneken et al., 2007), their presence in the SV eels could probably be linked to the exposure to this technical mixture before the ban. It could also be induced by debromination to lower brominated congeners of the technical deca-BDE mixture as described by Eljarrat and Barceló (2011), this mixture being the only one authorized in Europe.

3.2.3. PFAS

The PFAS sums observed in eels from the estuary are presented in Table 2. The values were between 75.25 and 123.67 ng/g dw with great variations within the different groups. A total of 17 PFAS were investigated and only 2 (PFOS and PFUnA) were detected in all muscle eels. The PFOSi was not detected in any eels. Among the 5 perfluoroalkylsulfonate substances (PFASS), only the PFOS was found in all eels. In contrast, the PFBS was not detected in any of the samples. The PFOS is known for its high bioaccumulative potential, whereas PFBS is considered non-bioaccumulative (Conder et al., 2008), which is consistent with present results. The PFHxS was observed in all the yellow eels but not detected in 2 SV eels. PFHpS was present in about one quarter of individuals, mainly in the SV and YB eels, but never in all the fish of these groups. Only 8 out of the 11 studied perfluorocarboxylic acids (PFCAs) were detected in eel muscles. The PFHxA was in only one fish (YV) and the PFUnA was in all eels. Not detected PFCAs were the PFBA, the PFPA and the PFHpA. The 6 others were found in all the eel groups but not in all the fish. According to Conder et al. (2008), the PFCAs with shorter carbon chain possess a very low or non-existent bioaccumulation potential that could explain the lack of detection of the PFCAs with 7 or less carbons.

PFAS regulation is recent and involves only few compounds. Since May 2009, perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), its salts and perfluorooctanesulfonyl fluoride (PFOSF) are part of the 9 substances added to the list of substances covered by the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (UNEP, 2009). As such, PFOS and derivatives are covered (restrictions on the marketing and use for substances) by Regulation (EU) No 207/2011 of Commission Regulation and Directive (EU) 2006/122/ECOF of the European Parliament and of the Council of 2 March 2011 and 12 December 2006, respectively. The EU EQS specific to PFOS was 9.1 ng/g ww for biota (European Commission, 2013). Three quarters of eels fished in this study exceeded this value (YV: 70%, YB: 90%, YHI: 50% and SV: 73%). The highest value was approximately 14 times higher than the UE EQS PFOS and was found in the muscle of one YB eel. To our best knowledge, data on the eel contamination by PFAS in Europe are scarce. It is therefore difficult to compare the levels at the national and the European scales. The predominant PFAS found in all species, tissues and locations around the world is the

PFOS (Houde et al., 2011). The level of PFOS in the present study ranged from 67.6 to 106.9 ng/g dw (17.9 to 39.0 ng/g ww) for the yellow eels and was 61.6 ng/g dw (26.6 ng/g ww) for the silver ones. In German water, the average levels of PFOS in different fish (herring, mackerel, eel, trout, carp, bream) ranged from 12.0 to 135.7 ng/g ww and the compound was not detected in 3 sites (Lake Storkow, North and Baltic Seas) (Schuetze et al., 2010). In this same study, the PFOA was not detected in any investigated samples. The distribution of 15 perfluorinated compounds in eels from aquatic systems in The Netherlands was studied by Kwadijk et al. (2010). The authors found only 3 PFAS in all eel filets. The PFOS was found to be the predominant compound with concentrations ranging from 7 to 58 ng/g ww. The two other PFAS, the PFHxS and PFDoA, were detected at a level approximately 10 times lower than the PFOS. In a comparative earlier study conducted also in the Netherlands, the PFOS ranged between <8 to 143 ng/g ww (Schrapp et al., 2004). Eels caught in Lake Möhne in Germany had PFOS concentrations ranging from 37 to 83 ng/g ww and a maximum PFOA concentration of 2.3 ng/g ww (Hölzer et al., 2011). However, the PFOA was not found in all fish from this lake and the other analyzed PFAS (PFDoA, PFUnA, PFDA, PFNA, PFHpA, PFHxA, PFHxS and PFBS) were not detected in any fish sample. Again, the absence or the lower levels of PFAS with a shorter carbon (<7 C) were found.

The presence of PFAS and particularly of PFOS in eels from the Loire could be explained by the industrial activities around the estuary. In fact, the Pays de la Loire region is France's foremost region for wood transformation, especially paper industry and for metal surface treatment industry, both of which represent potential sources of PFOS (Munsch et al., 2013).

Regarding the spatial (YV, YHI and YB) and the life stage (yellows vs silvers) differences, no significant differences between the PFAS sums were observed whatever the expression unit (ww, dw or LW) due to the very high variability of the concentrations of these groups, particularly expressed in LW. The PFAS accumulations in eels seem to be independent to the sampling site and life stage. In this study, the lipid content was negatively correlated with the PFAS sums, expressed as dw and ww, for the YHI eels ($p < 0.05$) and no correlation was found for the other groups.

The PFAS patterns (Fig. 5) showed that PFOS is the major detected PFAS. Its contribution to the sum was comprised between 84 and 88%. This is the major PFAS found in fish (Hoff et al., 2005; Hölzer et al.,

2011; Houde et al., 2011; Kwadijk et al., 2010; Labadie and Chevreuil, 2011; Miège et al., 2012; Schuetze et al., 2010). No differences between the three studied sites were found for the main PFAS (PFOS, PFDA, PFUnA and PFDoA). However, the YHI eels had a greater proportion of PFHxS than the two other groups. Regarding the life stage, the SV eels, like the YV and YB, had a lower proportion of PFHxS than YHI eels ($p = 0.037$). The YHI eels were caught after Nantes city thus the PFHxS contamination could be due to urban pressure (sewage effluents) and to industrial activities around this city, especially the paper industry. The PFUnA proportion was higher in the SV eels than in the YV eels ($p = 0.048$) among the main PFAS (PFOS, PFDA, PFUnA and PFDoA). The origin of this compound preferentially found in the SV eels was difficult to explain, notably due to the unknown living area of these silver individuals.

3.3. OH-PAHs, APs and BPA in eel bile

The BPA level, AP sums and OH-PAH sums are presented in Table 2. The 4-OP and the 9-OHPhe were not detected in the bile of any of the eel groups. In contrast, the 4-p-NP and the 1-OHPhe were found in all fish, whereas the other OH-PAHs and APs were not systematically detected. Because of the variability of the feeding status and the water level in the bile, some studies recommended the normalization of the biliary PAH metabolite concentration using the biliverdin or protein concentration in this biological matrix (Blahova et al., 2014; Nagel et al., 2012a; Ruddock et al., 2003). Investigating influences of the silvering process of the European eel on the PAH metabolite concentrations in bile, Nagel et al. (2012b) particularly recommended the use of a normalization. The protein concentration was chosen in this study to show levels normalized to protein concentrations as well as non-normalized measurements. The volume of bile of several eels was low and did not allow the analysis (YV: $n = 6/10$, YB: $n = 8/10$, YHI: $n = 6/10$ and SV: $n = 6/15$). Therefore, obtained results should be analyzed with caution. Nevertheless, they provide interesting data on the presence of contaminants poorly studied in the fish of the Loire estuary.

In the present study, the mean sums of OH-PAHs varied between 23.9 and 148.8 ng/mL bile with concentrations ranging from 25.5 to 100.5 ng/mL bile (11.3–20.4 $\mu\text{g/g}$ prot.) for the 1-OHPyr and from 3.6 to 38.0 ng/mL bile (1.4–5.0 $\mu\text{g/g}$ prot.) for the 1-OHPhe. European eels caught in the United Kingdom estuaries had 1-OHPyr and 1-OHPhe

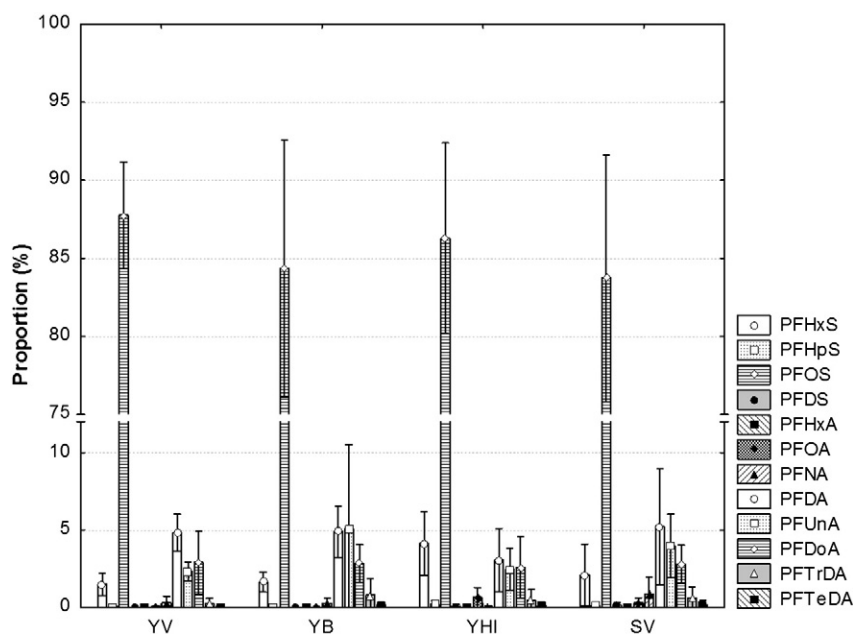


Fig. 5. Profiles of the 12 PFAS in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades ($n = 10$); YB: Bellevue ($n = 10$); YHI: Haute Indre ($n = 10$)) and silver eels (SV; $n = 15$). PFAS proportions were calculated with the sum of 12 detected PFAS. Error bars correspond to standard deviation.

contents from 120 to 7600 ng/mL bile and from 23 to 2096 ng/mL bile respectively (Ruddock et al., 2003). In eels from German rivers, the mean 1-OHPyr and 1-OHPhe detected values ranging from 10.9 to 2420.8 ng/mL bile and 52.7 to 632.4 ng/mL bile respectively (Nagel et al., 2012a). 1-OHNaph and 1-OHPyr were found in eels living in the Orbetello lagoon (Italy) at concentrations up to 8000 and 13,000 µg/mL bile, respectively (Gorbi et al., 2005). The contamination of eels in the Loire estuary is low compared with these levels depicted in eels from other European waters. These results are very surprising since the estuary of the Loire includes the second largest refinery of France, a coal-fired plant, an incinerator and a port with high activity (the 4th in France). All these activities are known to be sources of pollution, including PAHs, and the presence of metabolites in eel bile can provide information on the putative sources of PAH contamination. The 1-OHPyr, which is the prevalent compound detected in the eel biles in this study, is the main metabolite of pyrene. The pyrene is released by significant pyrolytic and petrogenic industrial processes. For this reason it is a common and widespread PAH (Ariese et al., 1993; Van Der Oost et al., 2003). The second greatest abundant metabolite found in bile eels from the Loire was the 1-OHPhe, one of the degradation metabolites of phenanthrene. This PAH is generated by the combustion of fossil fuels, in particular coal, oil and its refined products (O'Malley et al., 1996; Varanasi et al., 1989). Lower concentrations of 1-OHPhe compared with 1-OHPyr may be related to the fact that phenanthrene binds strongly to sediment particles reducing their bioavailability (Yuan et al., 2001). Furthermore, it was shown that some low molecular weight metabolites of phenanthrene were mainly excreted in the urine (Timbrell, 2000). Therefore, low levels in the bile may not reflect exactly the environmental exposure of the fish (Ruddock et al., 2003).

Among the three studied sites where yellow eels were caught, no differences between OH-PAH concentrations were found after the normalization of the protein contents of the bile ($p > 0.05$). Comparison between yellow and silver eels showed the same results, no difference was highlighted between the OH-PAH sums in bile ($p > 0.05$).

Among the five analyzed OH-PAHs, the 1-OHPyr was the most abundant (Fig. 6). It represented an average range between 36.0 and 80.8% of the sum of OH-PAHs. Although the 1-OHPyr is regarded as the most abundant compound present in fish bile and the best indicator of PAH

exposure in fish (Ariese et al., 1993; Beyer et al., 2010; Ruddock et al., 2003; Van Der Oost et al., 2003), this compound was not detectable in all eels in this study. Analysis of spatial influences showed differences for the 1-OHPyr, the 1-OHPhe and the 2-OHNaph. For the 1-OHPhe, YV eels had a significantly lower percentage of this metabolite than YB eels ($p = 0.009$). For the two other metabolites, it was the opposite; the YV eels had a significant higher proportion of 1-OHPyr and 2-OHNaph than the YB eels ($p = 0.044$ and $p = 0.020$) and also for this last than the YHI eels ($p = 0.041$).

Regarding life stage, differences were found for the 1-OHPhe and 2-OHNaph metabolites. SV eels had a greater percentage of 1-OHPhe than YHI and YV eels ($p = 0.044$ and $p = 0.012$). The 2-OHNaph was present in a lower proportion in the bile of SV eels than in YV eels ($p = 0.017$). This metabolite is an indicator of recent exposure to petrogenic compounds (Martínez-Gómez et al., 2013). Independent from the significant differences of individual OH-PAH proportions between sites and life stages, the distribution patterns of YV, YHI and SV eels seemed to be quite similar whereas those of YB eels were different, presenting high variability. These patterns seemed not to be balanced by the industrial, urban and agricultural activities. The origin of the OH-PAHs in eel bile and the organic compound behavior could be explained by the study of the PAHs in sediments.

APs and BPA were measured in the average range of 141.0–617.8 ng/mL bile and 36.8–3109.1 ng/mL bile respectively. Among the analyzed APs, two were mainly found: the 4-p-NP and the t-OP (concentrations ranging from 139.0 to 612.2 ng/mL bile and 2.8 to 15.1 ng/g bile, respectively). In the literature, no data seems to be available on wild eels. Nevertheless, some results were found for other fish species from the European waters. In the Bay of Biscay (Southwestern Europe), alkylphenolic compounds were measured in the bile of the thicklip grey mullet in the average range of 856–7483 and 21–153 ng/g of NP and OP levels respectively (Puy-Azurmendi et al., 2013). Biliary NP and t-OP were detected in *Alepocephalus rostratus* from the Western Mediterranean Basin with mean concentrations ranging from 42.5 to 67.1 ng/g bile for NP and from 7.9 to 14.2 ng/g bile for the t-OP (Koenig et al., 2013). Red mullets from polluted areas of the NW Mediterranean Sea showed mean concentrations that ranged from 0.34 to 28.3 µg NP/g bile and 30 to 250 ng t-OP/g bile (Martin-Skilton et al., 2006). The mean concentrations reported for red mullets caught at

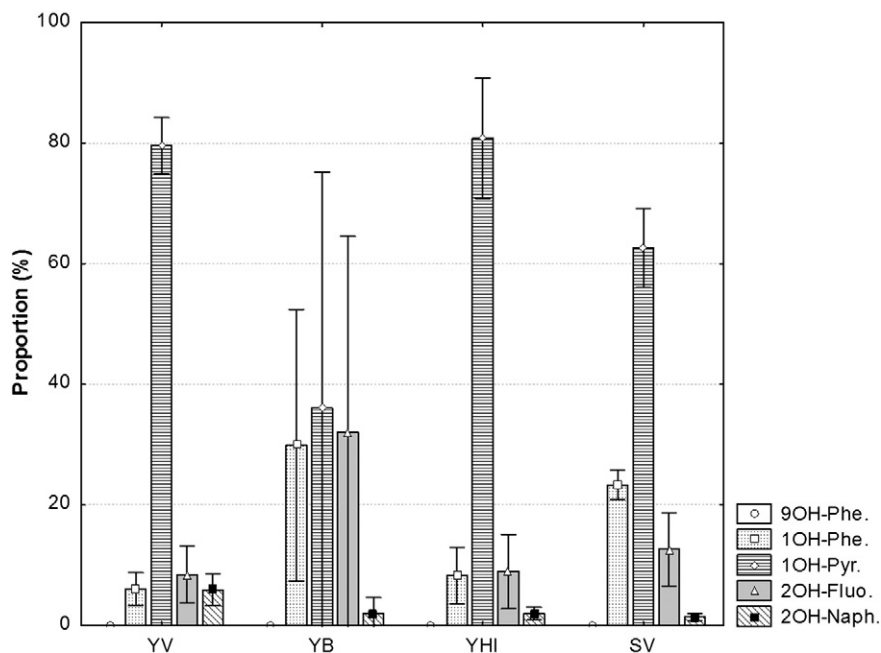


Fig. 6. Profiles of the 5 OH-PAHs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades ($n = 6$); YB: Bellevue ($n = 8$); YHI: Haute Indre ($n = 6$)) and silver eels (SV; $n = 6$). OH-PAH proportions were calculated considering the sum of 5 OH-PAHs. Error bars correspond to standard deviation.

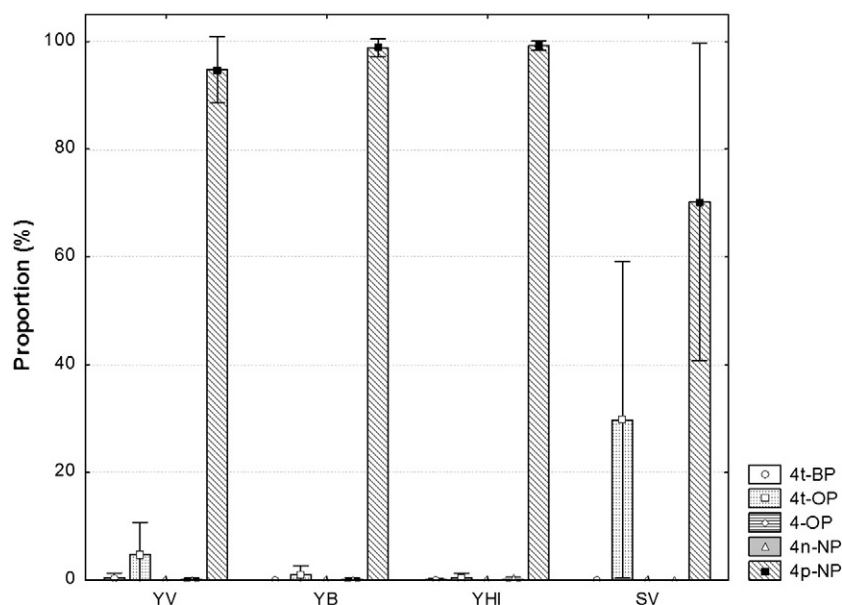


Fig. 7. Profile of the 5 APs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades ($n = 6$); YB: Bellevue ($n = 8$); YHI: Haute Indre ($n = 6$)) and silver eels (SV; $n = 6$). AP proportions were calculated with the sum of 5 APs. Error bars correspond to standard deviation.

several sites along the Spanish Mediterranean coast were 358.4–923.3 ng/g for the NP and 18.8–63.1 ng/g bile for t-OP (Martínez-Gómez et al., 2013).

Compared with these data, eels from the Loire estuary were less exposed to APs than other fish caught in different waters from Europe. Regarding BPA, it was found at concentrations similar to those found in some other studies. For example, in the bile from male breams collected in Netherlands, levels of BPA measured were 32.4 to 3082.3 ng/mL bile (Houtman et al., 2004).

Among the three sites of the Loire estuary, BPA was not detected in the bile of the YHI eels. The YV eels had high levels of BPA, 10 fold higher than the YB eels ($p = 0.007$). Regarding the life stage differences, the YV eels presented high BPA levels in the bile ($p < 0.001$), around 200 fold greater than the SV eels. Once again, these results are difficult to correlate to the different natures of site activities.

For the AP sums measured in the bile, no difference was found between the yellow eels. The SV eels had once again a lower mean AP sum, significantly different than those of the YHI eels ($p = 0.022$).

The AP pattern is presented in Fig. 7. The more abundant AP in the eel bile was the 4-p-NP with ranges from 70.2 to 99.2% followed by the 4-t-OP with a percentage comprised between 0.5 and 29.8%. As with the mean AP concentrations, no variation was found between profiles of the yellow eels from the three sampling sites. Regarding the life stage influence, the SV eels presented no significant difference with the YV eels and different patterns compared with the two other yellow groups. The SV eels had a greater percentage of 4-t-OP than the YHI and YB eels ($p < 0.002$) and a lower percentage of the 4-p-NP ($p < 0.005$). For APs, and independent from the significant differences of individual proportions between sites and life stages, the SV eels showed patterns slightly different than the yellow eels with high

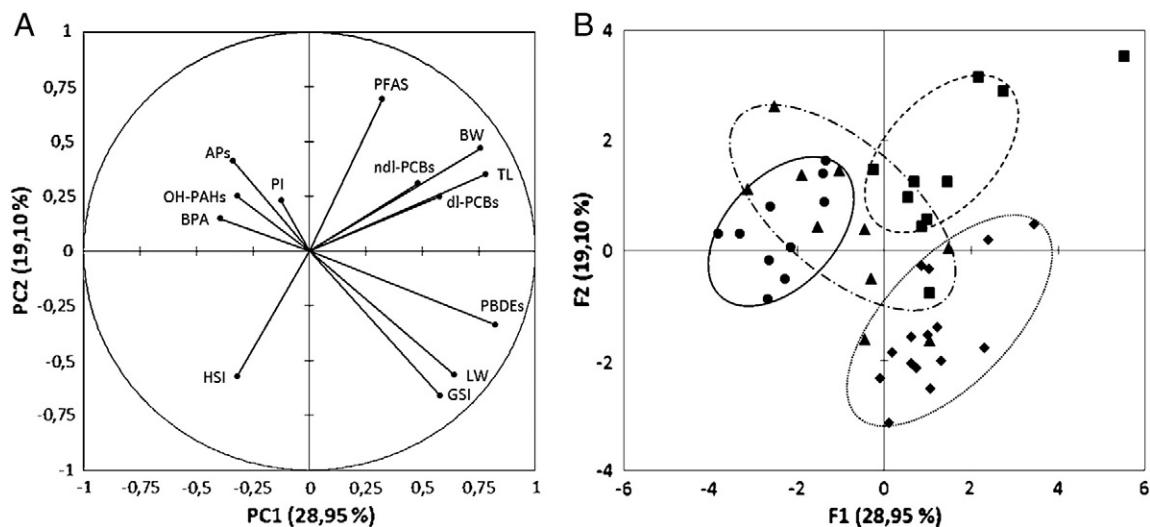


Fig. 8. Principal component analysis (PCA) of biometric parameters, contaminants (dl- and ndl-PCBs, PBDEs and PFAS expressed in ng/g dw) in muscle and contaminants (BPA, OH-PAHs and APs expressed in $\mu\text{g/g}$ prot.) in bile of yellow eels from 3 sampling sites in the Loire estuary (Varades ($n = 10$); Bellevue ($n = 10$); Haute Indre ($n = 10$)) and of silver eels ($n = 15$). A: correlation loadings (BW: body weight; TL: total length; LW: lipid weight). B: sample representation (circles = yellow eels from Varades; squares = yellow eels from Bellevue; triangles = yellow eels from Haute Indre; diamonds = silver eels).

variability. The difference as well as the variability could be explained by the fact that migrating silver eels could come from upstream areas more or less polluted. The sediment analysis could confirm the similar AP exposition of the eels in the different sites.

3.4. PCA results

The correlation loading and sample representation are shown in Fig. 8 (respectively panels A and B). The first two principal components (respectively PC1 and PC2) described 48% of the total variability among the eels. PC1 and PC2 represented respectively 29% and 19%. The correlation loadings (Fig. 8A) highlighted that the first PC was positively correlated to TL, BW, LW and PBDE. The second PC was positively correlated to PFAS and negatively to GSI. APs, OH-PAHs, BPA and PI presented low weight in the PC construction. Biometric parameters BW and TL correlated to each other and to ndl-, dl-PCBs and PFAS. All these variables were negatively correlated to HSI. Concerning LW, it appeared to be positively correlated to both GSI and PBDEs. Regarding the sample presentation (in Fig. 8B), the eels were clustered according to the life stages. About the sampling sites of the yellow eels, the eels from Varades were separated from the eels from Bellevue whereas the eels from Haute Indre were dispersed among the others. The comparison of Fig. 8A and Fig. 8B underlines that the eels from Bellevue were the biggest and the most highly contaminated by PFAS, ndl- and dl-PCBs (dw basis). Silver eels were highly contaminated by PBDEs with the highest lipid contents and GSI. The trends for the yellow eels from Varades and Haute Indre were contrary to the silver eels, e.g. low levels of PBDEs, LW and GSI. These observations are consistent with result explanations depicted in the previous paragraphs.

3.5. Human health risk assessment

Levels of 6 PCBi and TEQ values were showed in Table 3. Commission Regulation (EC) No 1259/2011 of 2 December 2011 had set maximum levels for dioxins and dioxin-like PCBs in a range of foodstuffs including wild eels (European Commission, 2011). In this study, the PCDD/F levels were not determined in the eels from the estuary, thus only dl-PCB TEQs were estimated. However, Total TEQ (1998) and dl-PCB TEQ (1998) values were determined using prediction models for fish ($\log \text{TEQ DL-PCBs} = -1.167(\pm 0.051) + 0.932(\pm 0.022) \times \log \Sigma \text{PCBi} + \text{PCB118}$) and $\log \text{TEQ Total} = -1.128(\pm 0.053) + 0.929(\pm 0.023) \times \log \Sigma (\text{PCBi} + \text{PCB118})$ (Babut et al., 2009).

The maximum levels set by the European Commission for specific oil species, including wild eels, were 3.5 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the PCDD/F TEQ and 10 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww PCDD/F TEQ + dl-PCBs TEQ (Total TEQ). Because no dl-PCB TEQ maximum value was set by the European Commission, the results were compared with the Total TEQ. Among the yellow eels, 7 individuals (4 YB and 3 YHI) had dl-PCB TEQs (2005) higher than the Total TEQ (2005) value (ranging from 10.85 to 16.93 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww) with a mean of 8.06 ± 4.67 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the YB and 7.18 ± 5.58 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the YHI. The YV eels had the lowest dl-PCB TEQ values (mean of 2.07 ± 1.21 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww). The SV eels had a dl-PCB TEQ mean (8.45 ± 2.05 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww) close to the

maximum value. Nevertheless, 2 individuals showed concentrations above this regulation (10.04 and 14.55 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww).

Few differences were found between calculated and predicted dl-PCB TEQs 1998, even if the prediction seems to be more accurate for the yellow eel values. Regarding the predicted Total TEQ (98), for the yellow and silver eels, the means estimated were above the 10 pg WHO₁₉₉₈ TEQ/g ww Total TEQ.

The maximum level for the sum of the 6 PCB indicators (PCB 28, 52, 101, 138, 153 and 180) was established at 300 ng/g ww (European Commission, 2011). One third of the yellow eels had a concentration of 6 PCBi higher than this value (ranging from 318.00 to 746.16 ng/g ww). The YB and YHI eels had the highest levels (mean of 329 ± 208 and 256 ± 170 ng/g ww, respectively) with 6/10 and 4/10 of the eels respectively, presenting concentrations higher than the maximum level. YV eels were the least contaminated (mean of 63 ± 28 ng/g ww). Silver eels presented intermediate levels and all individuals presented values lower than the maximum level.

The results indicated a potential exposure to PCBs through eel consumption, especially with the yellow eels. The tolerable daily intake (TDI) of 10 ng PCBi/kg body weight/day set by the French Food Safety Agency represents an intake of 700 ng/day for a 70 kg person or 150 ng/day for a child of 15 kg (French Food Safety Agency, 2010). Blanchet-Letrouvé et al. (2014) recommended the consumption of a portion of 150 g per month which would correspond to a daily intake of 1004 ng/day considering the mean concentration of all the eels (ranging from 109.0 to 3610.5 ng/day). In this study, it could then be recommended to limit the consumption to one portion of 105 g per month. For the sensitive populations (a portion of 60 g every two months), the average dietary intake would be 201 ng/day which was above the specific recommendation of the agency. The portion should be restricted to 45 g every two months. Considering the local practices (mean annual frequency of 2.6 times per year; Blanchet-Letrouvé et al., 2014) and the results of this study, it is possible to calculate an estimated dietary daily intake of PCBi of 222 ng/day. As reported by Blanchet-Letrouvé et al. (2014), considering the local practices, the risk seems to be moderate for adults but exists for sensitive populations. Nevertheless, according to the TDI, the recommendations of the agency about the consumed portions are not really adapted to the eels fished in the Loire estuary and should be revised.

The assessment of consumer risks from the intake of PFAS was also realized. The EFSA suggested that dietary exposure was the main exposure route to PFAS in the human population and that fish and other seafood were considered as the major contributors (European Food Safety Authority, 2012). In 2008, a risk assessment for the two major PFAS, the PFOS and the PFOA was performed by the EFSA Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel). The authority concluded that it was not probable that adverse effects of PFOS and PFOA are occurring in the general population. However to assess potential impacts on human health, the CONTAM Panel suggested a tolerable daily intake (TDI) of 150 ng/kg bw per day for PFOS and 1500 ng/kg bw per day for PFOA (Authority, 2008). These values were far above the concentrations found in the eels from the estuary. On average, fish consumption per capita in Europe was 22.1 kg (Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department, 2010). Thus, for a 70 kg

Table 3
Mean concentrations of 6 indicator PCBs ($\Sigma 6$ PCBi), dioxin-like PCB TEQ 1998 (dl-PCB TEQ (98)), dioxin-like PCB TEQ 2005 (dl-PCB TEQ (05)) and predicted TEQ concentrations for dioxin-like PCBs (predicted dl-PCB TEQ (98)) and Total TEQ (predicted Total TEQ (98)) according to the life stage.

	$\Sigma 6$ PCBi (ng/g ww)	dl-PCBs TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998/g)	dl-PCBs TEQ (05) (pg TEQ WHO 2005/g)	Predicted dl-PCB TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998/g)	Predicted Total TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998/g)
Yellow eels (n = 30)	216.34 ± 188.80 (22.53–746.16)	9.37 ± 7.61 (1.04–25.86)	5.77 ± 4.91 (0.50–16.93)	10.85 ± 8.80 (1.47–33.97)	11.67 ± 9.44 (1.59–36.43)
Silver eels (n = 15)	189.97 ± 34.68 (144.14–253.54)	12.35 ± 2.50 (9.26–18.99)	8.45 ± 2.05 (6.00–14.55)	9.91 ± 1.68 (7.71–13.05)	10.67 ± 1.80 (8.31–14.04)

Mean ± standard deviation; $\Sigma 6$ PCBi (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180); min–max values are presented into brackets.

person, with an average dietary daily intake of 60.5 g of fish, the potential dose of exposures of PFOS represented 10.4% and 14.4% of the TDI for consumption of yellow and silver eels respectively. For the PFOA, the potential dose exposures represented 0.004% and 0.012% of the TDI for the consumption of the yellow and silver eels respectively.

Regarding all the recommendations and the contaminant levels in eel muscles, a total of 13 individuals out of 45 were at least above one legal consumption limit and could be considered as unfit for human consumption.

4. Conclusion

The Loire, being considered as a wild river not highly polluted in France, has long been little studied. This study presented several data on biological status and monitored contaminant levels on the eels from the Loire estuary, associating risks to the fish consumers. It constitutes an important contaminant screening realized on wild European eels in a French river. Economic issues, particularly in terms of water quality, but also quality of the consumer products, such as fish, have led local and national public authorities to run programs for monitoring the estuary. It is another step in the monitoring of the environmental quality of the Loire estuary, which began with an initial study by Blanchet-Letrouvé et al. (2014). It would be interesting to follow the evolution over time of the levels and profiles of these POPs to check the progress thereof and thus, characterize potential sources of contamination. The results of this study showed that the levels of PCBs, PBDEs and PFAS in eel muscles from the Loire estuary were intermediate compared with eels from other European waters. The OH-PAH and AP concentrations in the eel bile could be considered as low compared with the European data whereas the BPA showed similar levels. The eels presented important variability of contaminant levels whatever the monitored location leading to attenuated differences between the sites and the life stages. The majority of eels exceeded the PFOS and PBDE EQS biota and a medium risk for the consumer has been demonstrated with 20% of the eels presenting values higher than the TEQ maximum level (33% considering the yellow eels only). A limited consumption of eels should be advised. To complete this first study, monitoring of sediment and water quality in the estuary should be undertaken.

Acknowledgments

The authors would like to express their special thanks to the region Pays de la Loire, the SMIDAP (Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire, arrêté N° 2012-06091) and the AADPPMFEDLA (Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels Maritimes et Fluviaux en Eau Douce de Loire-Atlantique) for their technical and financial support. The technical assistance of Claire Favreau and Emilie Perrat is gratefully acknowledged. The authors thank Darci (McCardle) Couderc for the English language revision of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.053>.

References

Ahrens L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *J Environ Monit* 2011;13:20–31.

Amilhat E, Fazio G, Simon G, Manetti M, Paris S, Delahaut L, et al. Silver European eels health in Mediterranean habitats. *Ecol Freshw Fish* 2013;23:49–64.

Andersson PL, Wagman N, Berg HA, Olsson P-E, Tysklind M. Biomagnification of structurally matched polychlorinated and polybrominated diphenylethers PCDE/PBDE in zebrafish *Danio rerio*. *Organohalogen Compd* 1999;43:9–12.

Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstra JW. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat Toxicol* 1993;26:273–86.

Authority EFS. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *EFSA J* 2008;6(5):1–131.

Babut M, Miegé C, Villeneuve B, Abarnou A, Duchemin J, Marchand P, et al. Correlations between dioxin-like and indicators PCBs: potential consequences for environmental studies involving fish or sediment. *Environ Pollut* 2009;157:3451–6.

Belpaire C, Goemans G. The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the water framework directive? *Life Environ* 2007;57:235–52.

Belpaire C, Goemans G, Geeraerts C, Quataert P, Parmentier K. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES J Mar Sci J Conseil* 2008;65:1483–91.

Belpaire C, Geeraerts C, Roosen L, Neels H, Covaci A. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environ Int* 2011;37:354–64.

Bettinetti R, Galassi S, Quadroni S, Volta P, Capoccioni F, Ciccotti E, et al. Use of *Anguilla anguilla* for biomonitoring persistent organic pollutants (POPs) in brackish and riverine waters in central and southern Italy. *Water Air Soil Pollut* 2011;217:321–31.

Beyer J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;30:224–44.

Blahova J, Divisova L, Kodes V, Leontovycova D, Mach S, Ocelka T, et al. Integrated assessment of PAH contamination in the Czech rivers using a combination of chemical and biological monitoring. *Sci World J* 2014;2014:1–6.

Blanchet-Letrouvé I, Zalouk-Vernoux A, Vénisseau A, Couderc M, Le Bizet B, Elie P, et al. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: spatial and biological variabilities. *Sci Total Environ* 2014;472:562–71.

Bodin N, Tapie N, Le Ménach K, Chassot E, Elie P, Rochard E, et al. PCB contamination in fish community from the Gironde estuary (France): blast from the past. *Chemosphere* 2014;98:66–72.

Boëtius I, Boëtius J. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1980;1:1–28.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

Bragigand V. Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (estuaires de Loire et de Seine) (PhD thesis) Nantes (France): Faculté de Pharmacie, Université de Nantes; 2005. p. 250.

Bragigand V, Amiard-Triquet C, Parlier E, Boury P, Marchand P, El Hourch M. Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Sci Total Environ* 2006;368:615–26.

Bultel E, Lasne E, Acou A, Guillaudeau J, Bertier C, Feunteun E. Migration behaviour of silver eels (*Anguilla anguilla*) in a large estuary of Western Europe inferred from acoustic telemetry. *Estuar Coast Shelf Sci* 2014;137:23–31.

Bureau S, Axelmann J, Broman D, Jakobsson E. Dietary uptake in pike (*Esox lucius*) of some polychlorinated biphenyls, polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers administered in natural diet. *Environ Toxicol Chem* 1997;16:2508–13.

Bureau S, Zebühr Y, Broman D, Ishaq R. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Sci Total Environ* 2006;366:659–72.

Cailleaud K, Forget-Leray J, Peluhet L, LeMenach K, Souissi S, Budzinski H. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ Pollut* 2009;157:64–71.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Consideration of proposals for amendment of appendices I and II. Fourteenth meeting of the Conference of the Parties, 3–15 June 2007. The Netherlands: The Hague; 2007. [39 pp.].

Corder JM, Hoke RA, Wd Wolf, Russell MH, Buck RC. Are PFCs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environ Sci Technol* 2008;42:995–1003.

Covaci A, Bervoets L, Hoff P, Voorspoels S, Voets J, Van Campenhout K, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in freshwater mussels and fish from Flanders, Belgium. *J Environ Monit* 2005;7:132–6.

Daverat F, Elie P, Lahaye M. Première caractérisation des histoires de vie des anguilles (*Anguilla anguilla*) occupant la zone aval du bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne: apport d'une méthode de microchimie. *Cybiom* 2004;28:83–90.

de Boer J, Dao QT, van Leeuwen SPJ, Kotterman MJJ, Schobben JHM. Thirty year monitoring of PCBs, organochlorine pesticides and tetrabromodiphenylether in eel from The Netherlands. *Environ Pollut* 2010;158:1228–36.

de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002;46:583–624.

Dekker W. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fish Manag Ecol* 2003;10:365–76.

Durif C, Dufour S, Elie P. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J Fish Biol* 2005;66:1025–43.

Durif C, Guibert A, Elie P. Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. In: Casselman JM, Cairns DK, editors. Eels at the edge: science, status, and conservation concerns, 58. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland; 2009. p. 103–11.

Elie P, Girard P. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. 1758. Cemagref. Bordeaux, Cemagref, ONEMA; 2009. p. 121.

- Eljarrat E, Barceló D. In: Eljarrat E, Barceló D, editors. The handbook of environmental chemistry: brominated flame retardants, 16. Springer Berlin Heidelberg; 2011.
- European Commission. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off J Eur Communities 2000;L327:1–72.
- European Commission. Environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union 2008;L 348:84–97.
- European Commission. Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs. Off J Eur Union 2011;50: 18–23.
- European Commission. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union 2013;L 226:1–17.
- European Food Safety Authority. Perfluoroalkylated substances in food: occurrence and dietary exposure. EFSA J 2012;10:2743–97.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. J Environ Manag 2012;104:19–34.
- Frame GM, Robertson LW, Hansen LG. The current state-of-the-art of comprehensive, quantitative, congener-specific PCB analysis, and what we now know about the distributions of individual congeners in commercial Aroclor mixtures. In: Robertson LW, Hansen LG, editors. PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects. Lexington, KY: University Press of Kentucky; 2001. p. 3–9.
- French Food Safety Agency. Opinion of the French Food Safety Agency on interpreting the health impact of PCB concentration levels in the French population; 2010.
- Gorbi S, Baldini C, Regoli F. Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European Eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). Arch Environ Contam Toxicol 2005;49:62–70.
- Hoff PT, Van Campenhout K, Van de Vijver K, Covaci A, Bervoets L, Moens L, et al. Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. Environ Pollut 2005;137:324–33.
- Hölzer J, Göen T, Just P, Reupert R, Rauchfuss K, Kraft M, et al. Perfluorinated compounds in fish and blood of anglers at lake Möhne, Sauerland area, Germany. Environ Sci Technol 2011;45:8046–52.
- Hoque MT, Yusoff FM, Law T, Syed MA. Effect of hydrogen sulphide on liver somatic index and Fulton's condition factor in *Mystus nemurus*. J Fish Biol 1998;52:23–30.
- Houde M, De Silva AO, Muir DCG, Letcher RJ. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: an updated review. Environ Sci Technol 2011;45:7962–73.
- Houtman CJ, van Oostveen AM, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. Environ Sci Technol 2004;38:6415–23.
- ICES. Report of the Joint EIFAC/ICES Working Group on eels (WGEEL), 3–9 September 2012, Copenhagen, Denmark. No. ICES CM 2012/ACOM:18; 2012. p. 824.
- ICES. Advice November 2013: widely distributed and migratory stocks – European eel. ICES Advice 2013. Book 2013;9:1–7.
- INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Pentabromodiphényléthers; 2012. p. 43 [DRC-12-126866-13678A].
- Jonsson G, Cavic A, Stokke TU, Beyer J, Sundt RC, Brede C. Solid-phase analytical derivatization of alkylphenols in fish bile for gas chromatography–mass spectrometry analysis. J Chromatogr A 2008;1183:6–14.
- Kammann U. PAH metabolites in bile fluids of Dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal changes. Environ Sci Pollut Res Int 2007;14:102–8.
- Koenig S, Porte C, Solé M, Sturve J. Biliary PAH and alkylphenol metabolites, biomarker enzyme activities, and gene expression levels in the deep-sea fish *Alepocephalus rostratus*. Environ Sci Technol 2013;47:2854–61.
- Kwadijk CJAF, Korytár P, Koelmans AA. Distribution of perfluorinated compounds in aquatic systems in the Netherlands. Environ Sci Technol 2010;44:3746–51.
- Labadie P, Chevreuil M. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). Environ Pollut 2011;159:391–7.
- Labadie P, Alliot F, Bourges C, Desportes A, Chevreuil M. Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. Anal Chim Acta 2010;675: 97–105.
- Lloret J, Gil de Sola L, Souplet A, Galzin R. Effects of large-scale habitat variability on condition of demersal exploited fish in the north-western Mediterranean. ICES J Mar Sci J Conseil 2002;59:1215–27.
- Macgregor K, Oliver IW, Harris L, Ridgway IM. Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: current levels and temporal trends. Environ Pollut 2010;158:2402–11.
- Malarvannan G, Belpaire C, Geeraerts C, Eulaers I, Neels H, Covaci A. Assessment of persistent brominated and chlorinated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium: levels, profiles and health risk. Sci Total Environ 2014; 482–483:222–33.
- Martínez-Gómez C, Lamoree M, Hamers T, van Velzen M, Kamstra JH, Fernández B, et al. Integrated chemical and biological analysis to explain estrogenic potency in bile extracts of red mullet (*Mullus barbatus*). Aquat Toxicol 2013;134–135:1–10.
- Martin-Skilton R, Lavado R, Thibaut R, Minier C, Porte C. Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. Environ Pollut 2006; 141:60–8.
- McHugh B, Poole R, Corcoran J, Anninou P, Boyle B, Joyce E, et al. The occurrence of persistent chlorinated and brominated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Irish waters. Chemosphere 2010;79:305–13.
- Miège C, Peretti A, Labadie P, Budzinski H, Le Bizet B, Vorkamp K, et al. Occurrence of priority and emerging organic compounds in fishes from the Rhone River (France). Anal Bioanal Chem 2012;404:2721–35.
- Munschy C, Marchand P, Venisseau A, Veyrand B, Zendong Z. Levels and trends of the emerging contaminants HBCDs (hexabromocyclododecanes) and PFCs (perfluorinated compounds) in marine shellfish along French coasts. Chemosphere 2013;91:233–40.
- Nagel F, Kammann U, Wagner C, Hanel R. Metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bile as biomarkers of pollution in European eel (*Anguilla anguilla*) from German Rivers. Arch Environ Contam Toxicol 2012a;62:254–63.
- Nagel F, Wagner C, Hanel R, Kammann U. The silencing process of European eel (*Anguilla anguilla*) influences PAH metabolite concentrations in bile fluid: consequences for monitoring. Chemosphere 2012b;87:91–6.
- O'Malley VP, Abrajano TA, Hellou J. Stable carbon isotopic apportionment of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in St. John's Harbour, Newfoundland. Environ Sci Technol 1996;30:634–9.
- ONEMA. Les données du plan national d'action PCB. <http://www.pollutions.eaufrance.fr/pcb/resultats-xls.html>, 2012.
- Osako K, Kuwahara K, Saito H, Hossain MA, Nozaki Y. Effect of starvation on lipid metabolism and stability of DHA content of lipids in horse mackerel (*Trachurus japonicus*) tissues. Lipids 2003;38:1263–7.
- Palstra AP, Heppener DFM, van Ginneken VJT, Székely C, van den Thillart GEEJM. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. J Exp Mar Biol Ecol 2007;352:244–56.
- Puy-Azurmendí E, Ortiz-Zarragoitia M, Villagrasa M, Kuster M, Aragón P, Atienza J, et al. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). Sci Total Environ 2013;443: 233–44.
- Quadroni S, Galassi S, Capoccioni F, Ciccotti E, Grandi G, De Leo G, et al. Contamination, parasitism and condition of *Anguilla anguilla* in three Italian stocks. Ecotoxicology 2013;22:94–108.
- Reckordt M, Ubl C, Wagner C, Frankowski J, Dorow M. Downstream migration dynamics of female and male silver eels (*Anguilla anguilla* L.) in the regulated German lowland Warnow River. Ecol Freshw Fish 2014;23:7–20.
- Ricciardi F, Matozzo V, Binelli A, Marin MG. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: an integrated approach in biomonitoring estuarine environments. Water Res 2010;44:1725–36.
- Roosens L, Geeraerts C, Belpaire C, Van Pelt I, Neels H, Covaci A. Spatial variations in the levels and isomeric patterns of PBDEs and HBCDs in the European eel in Flanders. Environ Int 2010;36:415–23.
- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. Sci Total Environ 2003;301:105–17.
- Schrap S, Pijnenburg AMCM, Geerdink R. Geperfluoreerde verbindingen in Nederlands oppervlaktewater. RIZA—report. Lelystad, The Netherlands: Rijkswaterstaat; 2004.
- Schuetze A, Heberer T, Effkemann S, Juergensen S. Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. Chemosphere 2010; 78:647–52.
- Stapleton HM, Letcher RJ, Li J, Baker JE. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Environ Toxicol Chem 2004 aa;23:1939–46.
- Stapleton HM, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Environ Sci Technol 2004 bb;38:1054–61.
- Stapleton HM, Alaei M, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. Environ Sci Technol 2004 cc;38:112–9.
- Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. In: FAO Yearbook, editor. Fishery and aquaculture statistics. (2008). Rome: FAO; 2010. p. 72.
- Sühling R, Möller A, Freese M, Pohlmann J-D, Wolschke H, Sturm R, et al. Brominated flame retardants and dechloranes in eels from German Rivers. Chemosphere 2013; 90:118–24.
- Tabouret H, Bareille G, Mestrot A, Caill-Milly N, Budzinski H, Peluher L, et al. Heavy metals and organochlorinated compounds in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary and associated wetlands (France). J Environ Monit 2011;13: 1446–56.
- Tapie N, Le Menach K, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. Chemosphere 2011;83:175–85.
- Timbrell J. Factors affecting toxic responses: disposition. Principles of biochemical toxicology. Philadelphia, USA: Taylor & Francis; 2000.
- Turner A. Salting out of chemicals in estuaries: implications for contaminant partitioning and modelling. Sci Total Environ 2003;314–316:599–612.
- Van Ael E, Belpaire C, Breine J, Geeraerts C, Van Thuyne G, Eulaers I, et al. Are persistent organic pollutants and metals in eel muscle predictive for the ecological water quality? Environ Pollut 2014;186:165–71.
- UNEP (United Nations environment programme) CN.524.2009. TREATIES-4. Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22 May 2001. Adoption of amendments to Annexes A, B and C by decisions SC-4/10, 4/11, 4/12, 4/13, 4/14, 4/15, 4/16, 4/17 and 4/18; 2009.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ Health Perspect 1998;106:775.

- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006;93:223–41.
- Van Den Thillart G, Van Ginneken V, Körner F, Heijmans R, Van Der Linden R, Gluvers A. Endurance swimming of European eel. *J Fish Biol* 2004;65:312–8.
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;13:57–149.
- Van Ginneken V, Durif C, Dufour S, Sbailhi M, Boot R, Noorlander K, et al. Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) living in saltwater. *Anim Biol* 2007;57:453–66.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139–77.
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: Varanasi U, editor. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 93–150.
- Vial J, Jardy A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Anal Chem* 1999;71:2672–7.
- Ying G-G, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ Int* 2002;28:215–26.
- Yuan SY, Chang JS, Yen JH, Chang B-V. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere* 2001;43:273–8.



Review

Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments?☆



Nam Ngoc Phuong^{a, b}, Aurore Zalouk-Vergnoux^{a, b, *}, Laurence Poirier^{a, b},
Abderrahmane Kamari^{a, b}, Amélie Châtel^{a, b}, Catherine Mouneyrac^{a, b}, Fabienne Lagarde^c

^a Laboratoire de Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, Nantes F-44322, France

^b Université Catholique de l'Ouest, Angers F-49000, France

^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Université du Maine, Avenu Olivier Messiaen, Le Mans F-72085, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2015

Received in revised form

16 December 2015

Accepted 17 December 2015

Available online xxx

Keywords:

Microplastics

Field samples

Laboratory exposures

Ingestion

Biological effects

ABSTRACT

The ubiquitous presence and persistency of microplastics (MPs) in aquatic environments are of particular concern since they represent an increasing threat to marine organisms and ecosystems. Great differences of concentrations and/or quantities in field samples have been observed depending on geographical location around the world. The main types reported have been polyethylene, polypropylene, and polystyrene. The presence of MPs in marine wildlife has been shown in many studies focusing on ingestion and accumulation in different tissues, whereas studies of the biological effects of MPs in the field are scarce. If the nature and abundance/concentrations of MPs have not been systematically determined in field samples, this is due to the fact that the identification of MPs from environmental samples requires mastery and execution of several steps and techniques. For this reason and due to differences in sampling techniques and sample preparation, it remains difficult to compare the published studies.

Most laboratory experiments have been performed with MP concentrations of a higher order of magnitude than those found in the field. Consequently, the ingestion and associated effects observed in exposed organisms have corresponded to great contaminant stress, which does not mimic the natural environment. Medium contaminations are produced with only one type of polymer of a precise sizes and homogenous shape whereas the MPs present in the field are known to be a mix of many types, sizes and shapes of plastic. Moreover, MPs originating in marine environments can be colonized by organisms and constitute the sorption support for many organic compounds present in environment that are not easily reproducible in laboratory. Determination of the mechanical and chemical effects of MPs on organisms is still a challenging area of research. Among the potential chemical effects it is necessary to differentiate those related to polymer properties from those due to the sorption/desorption of organic compounds.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plastics is a generic name encompassing most of the synthetic organic polymers exhibiting the property of plasticity. These products present many advantages: they are inexpensive, water and corrosion-resistant, chemically inert, easily molded, and they exhibit good thermal and electrical insulating properties. All these features explain why they are massively used in our daily lives. Since the mid-20th century, several million tons of plastics have

been produced (Thompson et al., 2009) and in 2013, worldwide plastic production was estimated at 288 million tons (Free et al., 2014). Whilst the societal benefits of plastic are undeniably far-reaching (Andrady and Neal, 2009), this valuable commodity is nonetheless the subject of increasing environmental concern. Indeed, plastics present many disadvantages: being nonrenewable resources and sources of contamination by additive compounds; undergoing embrittlement at low temperatures and deformation under loads; going through a costly recycling process; being highly resistant to degradation, etc. It has been estimated that ten percent of the plastics produced end up in the ocean. Jambeck et al. (2015) recently made the approximate calculation that in 2010 alone, 4.8 to 12.7 million metric tons of plastic wastes entered the ocean and pointed out that a steady increase is to be expected in the coming

☆ This paper has been recommended for acceptance by Klaus Kummerer.

* Corresponding author.

E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

years. After less than a century of existence, plastic debris already represent from 60 to 80% of marine litter depending on the locations investigated (Derraik, 2002). Once in the environment, macrodebris undergo mechanical (erosion, abrasion), chemical (photo-oxidation, temperature, corrosion) and biological (degradation by microorganisms) actions (Andrady, 2011; Costa et al., 2010; Zettler et al., 2013). These different degradation processes lead to their fragmentation into microplastics (MPs), which accumulate in the environment.

The term of MP was initially suggested by Thompson (Thompson et al., 2004). The size defining MPs varies according to authors with diameters of $>1.6 \mu\text{m}$ (Ng and Obbard, 2006) and $<1 \text{ mm}$ (Browne et al., 2007, 2010; Claessens et al., 2011), $<2 \text{ mm}$ (Ryan et al., 2009), $2\text{--}6 \text{ mm}$ (Derraik, 2002), $<5 \text{ mm}$ (Barnes et al., 2009), $<10 \text{ mm}$ (Graham and Thompson, 2009). Nowadays, most researchers agree with the definition of MPs proposed by Arthur et al. (2009) of MPs as particles in a size range of less than 5 mm . Those originating from the fragmentation of larger plastic items are defined as secondary MPs whereas primary MPs include all micro-sized particles entering the environment: such as fibers, industrial pellets and microbeads from cosmetics, for example (Andrady, 2011).

Whatever the definition of their size, MPs represent a very broad range of polymers. The most commonly used plastic materials are polyethylene (PE), PP, polyvinyl chloride (PVC), PS and polyethylene terephthalate (PET). They represent approximately 90% of the total world production (Andrady and Neal, 2009) and, as non-biodegradable polymers, they are expected to be among the most widely represented in sampled MPs. What happens to them in the environment will probably differ according to their chemical nature and physical properties. Being buoyant in water; PE and PP float in seawater, mainly affect ocean surface and deposit ashore (Engler, 2012; Thompson et al., 2009) whereas PVC, which is denser than seawater, affects seabed, often next to the source (Engler, 2012). According to the most recent ten years of research, it appears that all natural habitats from pole to pole are affected by the presence of MPs (Wright et al., 2013).

The ubiquitous presence and persistency of MPs in aquatic environments are of particular concern since they represent an increasing threat to marine organisms and ecosystems. To evaluate this threat and the potential impacts of MPs on aquatic organisms, a number of laboratory experiments have been performed over recent years to mimic exposure (Nobre et al., 2015; Van Cauwenberghe et al., 2015). The global aim of this review is to compare the available literature data on MPs (size, form, quantity or concentration) having been sampled around the world with those having been employed in laboratory experiments. In this paper, we try to answer the following questions: i) Which MPs are found in the different environmental compartments (water, sediment, biota) of the marine ecosystems? ii) What are the laboratory conditions of exposure and putative ingestion of MPs by organisms, as well as their biological transfer and trophic transfer? iii) Are experimental laboratory exposures indeed consistent with this exposome? iv) Do the toxicity effects reported on a wide range of aquatic organisms actually reflect environmental reality?

2. Which MPs are found in the different environmental compartments?

2.1. MPs in marine waters

Due to their small size and capacity to float on the surface of seas and oceans, MPs are distributed in all marine ecosystems. At least 29 marine areas in the world have been investigated (detailed in Table 1).

Differences between sites are observed in MP concentrations and/or quantities. The Pacific Ocean is the most widely sampled area. When comparable, the measured concentrations in this ocean vary from almost 27,000 (Eriksen et al., 2013) to 448,000 (Goldstein et al., 2013) particles per km^2 and from 0.004 (Doyle et al., 2011) to 9200 (Desforges et al., 2014) particles per m^3 . This uneven distribution is partially accounted for by the well-known zone of concentration in the North Pacific Central Gyre, where the large-scale presence of plastic debris has previously been highlighted. Indeed, several studies have shown that quantities and distributions of MPs are pronouncedly dependent on geophysical processes (wave, wind, water current; Goldstein et al., 2013; Wright et al., 2013). For example, the highest densities of MPs were detected in the Northeast Pacific Ocean under low-wind conditions (Goldstein et al., 2013). In the Atlantic Ocean, all reported plastic concentrations have been significantly lower than in Pacific areas with only 1500 particles per km^2 (Law et al., 2010) and 2.5 particles per m^3 (Lusher et al., 2014) in the most polluted zones. The Mediterranean Sea is another high spot of MP presence and a recent publication reported high levels of concentrations compared to the Atlantic Ocean (62,000 particles per km^2 for the lowest concentration; Collignon et al., 2014). Considerable research activity in the European zone has recently taken place since the Mediterranean Sea is a “closed sea” surrounded by urbanized areas, which may explain the high quantity of MPs (Cózar et al., 2015).

A reason other than geographic disparities for which it remains difficult to directly compare the reported MP concentrations/quantities is that the sampling techniques and analytical methodologies used in sample analysis are highly varied. For water samples, differences in sampling protocols lead to obvious difficulties of comparison between studies. Indeed, concentration data are usually expressed in terms of number of particles either by volume of filtered water (cubic meters) in the case of water pumping; or by area of waters covered (square meters) when using a trawl along a transect. The unit difference underlines the lack of standardized sampling methodology. Number of particles per km^2 implies that samples came mostly from water surfaces whereas particles per m^3 are likely to correspond to water column sampling. Given the wide range of polymer densities, these differences in sampling depth will surely affect results in terms of both concentration and polymer nature, even though Carson et al. (2011) have shown that in the water column, 95% of small plastic debris were concentrated in the top 15 cm. For example, the use of trawl enables MPs to be sampled on large surface areas. On the other hand, while pumped samples are more representative of MP distribution in the water column, this is only the case at a sampling point. Moreover, as seen in a few recent studies, depending on the protocol used the mesh aperture of nets can vary from around $330 \mu\text{m}$ (the most commonly used so far) to less than $50 \mu\text{m}$ (Hidalgo-Ruiz et al., 2012). As high volumes of sieved water lead to a rapid clog the lowest sizes of mesh aperture are less frequently employed. In addition, extraction and analysis of particles smaller than $330 \mu\text{m}$ is more challenging (Desforges et al., 2014).

Despite differences of MP concentrations/quantities, and even though the MP type was mentioned in only 6 studies out of 25, differences in MP types can be noticed are apparent, since PE and PP fragments have been found in sea water samples from America and Australia, while PE and PS have been observed in Europe.

2.2. MPs in sediment/sand samples

It is well-known that sediments are the long-term ultimate sink for of contaminants (Chapman and Wang, 2001). Table 2 illustrates some examples of MPs reported in the sediment compartment over the last 40 years.

As it is shown in Table 2, America, Asia and Europe are the most

Table 1

Sampling continent and area, quantity or concentration, type or form of MPs found in sea water samples and references of the corresponding studies.

Continent	Area	Quantity or concentration	Microplastics (type or form)	References
America	Western North Atlantic	3500 particles/km ²	Pellets 2.5–5 mm	Carpenter and Smith (1972)
	North Pacific Ocean	0.004–0.19 particles/m ³	Fragment predominant	Doyle et al. (2011)
	Atlantic	<0.1 particles/m ³	Fragment predominant	
	South Pacific SG	26,898 pieces/km ²	Fragment predominant	Eriksen et al. (2013)
	North Pacific SG	32.76 particles/m ³	Fragment predominant	Goldstein et al. (2012)
	Equatorial Atlantic Ocean	0.01 particles/m ³	Fragment predominant	Ivar do Sul et al. (2013)
	Southern Californian	3.92 items/m ³	Fragment predominant	Lattin et al. (2004)
	North Atlantic Ocean	1534 pieces/km ²	PE + PP 99%	Law et al. (2010)
	Caribbean Sea	1414 pieces/km ²	PE + PP 99%	
	North Pacific Gyre	2.23 particles/m ³	PP monofilament predominant	Moore et al. (2001)
	North Pacific Central Gyre	334,271 fragments/km ²	Fragment 58.5%	
	Southern California	7.25 particles/m ³	Fragment 92.7–100%	Moore et al. (2002)
	North Pacific offshore	0.43–2.23 particles/m ³	Fragment predominant	Moore et al. (2005)
	North Pacific, inshore	5–7.25 particles/m ³		
	Pacific Ocean	370,000 particles/km ²	Fragment 92.6%	Shaw and Day (1994)
	NE Pacific Ocean	8 to 9200 particles/m ³	Fibers 75%	Desforges et al. (2014)
	Northeast Pacific Ocean	0.021–0.448 particles/m ²		Goldstein et al. (2013)
	Western Pacific Ocean	87,000 pieces/km ²	Fragment 56%	Yamashita and Tanimura (2007)
Asia	China	0.167 particles/m ³	Fibers, granules	Zhao et al. (2014)
Australia	Australia	4256–8966 pieces/km ²	PE + PP 98.5%	Reisser et al. (2013)
Europe	North Sea	50–100 fibers/l	Fibers predominant	Buchanan (1971)
	Mediterranean Sea	0.116 particles/m ²	Filaments, PS	Collignon et al. (2012)
	Italian coast	0.62 particles/m ³	Plastic fragment	Fossi et al. (2012)
	Plymouth, UK	<0.04 pieces/m ³	Plastic fibers	Thompson et al. (2004)
	French–Belgian–Dutch	0.1–0.7 particles/l	LDPE, HDPE and PS predominant	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	Mediterranean–Corsica	6.2 particles/100 m ²	Filaments, PS	Collignon et al. (2014)
	Northeast Atlantic Ocean	2.46 particles/m ³	Plastic fibers > 80.3%	Lusher et al. (2014)
	Mediterranean Sea	243,853 items/km ²	Fragment 87.7%	Cozar et al. (2015)
	Western Mediterranean	0.15 items/m ³	Foam, filament, pellet	Lucia et al. (2014)

Table 2

Sampling continent and area, quantity or concentration, type or form of MPs found in sediment/sand samples and references of the corresponding studies.

Continent	Area	Quantity or concentration	Microplastic (type or form)	References
America	Kamilo Beach**	248 items/m ³	PE 85%, PP 14%	Carson et al. (2011)
	Florida**	116–214 piece/l	Fragment predominant	Graham and Thompson (2009)
	Maine**	105 piece/l	Fragment predominant	
	Canada*	<10 particles/m	PE predominant, virgin pellets	Gregory (1983)
	Bermuda*	>5000 particles/m	PE predominant, virgin pellets	
	Pacific Ocean*	27 items/m ² (1–4.75 mm)	Fragment 89%	Hidalgo-Ruiz and Thiel (2013)
	Noronha Archipelago*	15 particles/kg	Fragment 65%; pellet 23%	Ivar Do Sul et al. (2009)
	Canada**	2–8 pieces/g	Plastic fibers	Mathalon and Hill (2014)
	Hawaiian beaches*	43.4 particles/l	fragment 87%, plastic pellets 11%	McDermid and McMullen (2004)
	Oman Gulf*	>100 particles/m ²	PE predominant, virgin pellets	Khordagui and Abu-Hilal (1994)
Asia	Arabian Gulf*	To 80,000 particles/m ²	PE predominant, virgin pellets	
	Sea of Japan*	8–17 particles/m ²	Fragment 41%	Kusui and Noda (2003)
	Singapore**	0–4 particles/sample	PE and PS predominant	Ng and Obbard (2006)
	Indian Ocean**	81.43 mg/kg	Fragment 100%	Reddy et al. (2006)
	India*	68.83 items/m ²	Fragment predominant	Jayasiri et al. (2013)
	Singapore**	36.8 particles/kg	PE, PP, nylon and PVC	Mohamed Nor and Obbard (2014)
	China*	4137.3 particles/m ³	Fibers, granules	Zhao et al. (2014)
	Korea*	Up to 27,606 particles/m ²	PS expanded > 96%	Lee et al. (2013)
	SW Indian Ocean**	26 particles/l	Plastic fibers	Woodall et al. (2014)
	New Zealand*	>1000 particles/m	PE and PP predominant	Gregory (1977)
Australia	Tamar Estuary, UK**	32 items/sample	<1 mm, PVC 26%; Polyester 35%	Browne et al. (2010)
	Belgian coast**	<391 particles/kg	<1 mm, fiber 59%, granule 25%	Claessens et al. (2011)
	Russian beaches*	5–10 particles/m ²	Fragment 55.6%	Kusui and Noda (2003)
	Plymouth, UK**	>10 pieces/l	Plastic fibers	Thompson et al. (2004)
	Maltese coast*	>1000 pieces/m ²	PE, plastic pellets	Turner and Holmes (2011)
	French–Belgian–Dutch**	0.3–11.7 particles/kg	LDPE, HDPE and PS predominant	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	Venice, Italy**	672–2175 pieces/kg	PE + PP 82%	Vianello et al. (2013)
	Slovenia*	Up to 155.6 particles/kg	MPs (1–5 mm) > 74%; fibers, fragments	Laglbauer et al. (2014)
	North Sea**	1.3–2.3 particles/kg	PP, PE, PET, PVC, PS and polyamide	Dekiff et al. (2014)
	NE Atlantic Ocean**	324 particles/l	Plastic fibers (polyester 53.4%)	Woodall et al. (2014)
Europe	Mediterranean Sea**	350 particles/l		

*: sandy samples (mineral deposit); **: sediment samples (deposit rich in organic matter).

widely studied continents as regards the quantification of MPs in sandy samples and sediments. Studies in Europe deal mainly with sediments (8 out of 11) whereas studies on sandy samples are

predominant in Asia (6 out of 10) and in America there are as many studies on sandy samples as on sediments. Concerning the geographical comparison of MP quantity in sandy/sediment

samples, the location of studied areas seemed to be the main factor influencing MP distribution in the field. When comparable, the measured concentrations of MPs in the sediments ranged widely, from almost 0.3 (Van Cauwenberghe et al., 2015) to 2175 (Vianello et al., 2013) particles per kg and from 27 (Hidalgo-Ruiz and Thiel, 2013) to 80,000 (Khordagui and Abu-Hilal, 1994) particles per m² in sandy samples.

As for water samples, due to differences in sampling techniques it remains difficult to directly compare the reported MP concentrations/quantities or types. Sandy/sediment samples are usually collected from the coast at low tide (Hidalgo-Ruiz et al., 2012). The depth at which they are found, the masses of the samples and the tide level have tended to vary considerably between the different studies. For sampling at low tide from the coast, different types of tools are usually used according to sample location: stainless-steel spoons, spatula and box corer. For sampling at high tide, it is possible to use a corer and bottom trawl. The diversified sampling methods lead to results expressed in different units, making it difficult to compare between published studies. Quantification of MPs in sandy samples is usually expressed in number of particles per unit of distance and surface (Gregory, 1983; Hidalgo-Ruiz and Thiel, 2013; Kusui and Noda, 2003) while for sediment samples, MP quantities are usually expressed in number of particles per unit of volume (Graham and Thompson, 2009; Woodall et al. 2014) or per m³ (Carson et al. 2011). However, number of particles per unit of mass has been used for both types of samples, i.e. Ivar Do Sul et al. (2009) for sandy samples and Claessens et al. (2011) as well as Vianello et al. (2013) for sediments. This discrepancy is once again due to a lack of standardization for sampling protocols.

In addition to differences between sample collections, sediment sample preparation can lead to a variability of results between studies. Filtration and/or extraction protocols based on separation by density are usually employed for the quantification of MPs from sand and sediment samples. However, different sizes of sieves and filters have been reported. For example, Claessens et al. (2011) studied MPs between 38 µm and 1 mm and Laglbauer et al. (2014) from 1 to 5 mm. Besides, solutions of water saturated with sodium chloride (Thompson et al., 2004) or sodium iodide (Claessens et al., 2013) have been used to extract MPs from sediment samples. The use of these two different salts generates different densities of solutions (1.2 g cm⁻³ for saturated sodium chloride and 1.6 g cm⁻³ for sodium iodide at 3.3 M) leading to variations in MP extraction capacity.

Concerning the different MP types found in sand/sediment samples, when mentioned in studies, PE has been largely predominant. The presence of PE is quite surprising since it is a low-density polymer and should float at the sea surface. This observation supports the hypothesis of a possible colonization of organisms on these MPs leading to increased density (Zettler et al., 2013; Harrison et al., 2014).

2.3. MPs in marine organisms

The MPs found in marine organisms may be the result of their ubiquitous presence in highly abundant marine ecosystems. By using a manta trawl lined with 333 µm mesh at 11 random sites of the North Pacific Ocean, Moore et al. (2001) showed that although plankton organisms were approximately five times more abundant than plastic particles, the total mass of plastic was six times greater than that of plankton. These results underlined the fact that MPs have a high potential to affect organisms due to their numerous contacts with one another, as well as with the different organisms.

The presence of MPs in organisms from marine ecosystems is now well-established (Desforjes et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). A majority of

studies have focused on the ingestion of MPs in various species ranging from invertebrate to marine mammal. However, to date, data on the biological effects of MPs on marine organisms are still scarce. The types and quantities of MPs found in different marine species are indicated in Table 3.

Many types of organisms are represented in these studies, including zooplankton, polychaete, bivalve, crustacean, fish, sea-birds and mammals. Fish and seabirds have been the most widely studied organisms in marine ecosystems. Concerning the composition of the MPs found in the biota, information remains with only 3 studies having been published on PE, PP or polyamide (Moore et al., 2001; Lusher et al., 2013; Besseling et al., 2015). The MP forms were widely indicated with filaments/fibers having been found, mostly in less evolved organisms: from zooplankton to Thaliacea, with and fragments in more evolved organisms from fish to mammals. As for water and sand/sediment samples, the units of the measured variables have differed between studies. The units were particles per gram or per individual or a proportion (%) of individuals with MPs recovered in part of the digestive tract, which does not allow evaluation of quantitative contamination in organisms. MPs were detected in many organisms as mentioned in Table 3 and detailed in the following paragraph.

Regarding the species of zooplankton in the Northeast Pacific Ocean, Desforjes et al. (2015) reported MP quantity in *Neocalanus cristatus* and *Euphausia pacifica*. They showed that MPs were probably filtered by these species, the ingestion rate being dependent on their feeding mode, with MPs being found particularly in non-selective feeding species.

MPs found in the fecal casts of two polychaete species (*Clymenella torquata* and *Alitta virens*) were equivalent to those found in sediment samples suggesting that ingestion of MPs equals egestion by the polychaete (Mathalon and Hill, 2014).

As a well-known bioindicator for environmental pollution in marine species, the mussel *Mytilus edulis* is the most widely studied group among marine organisms (4 studies). Low quantities of MPs were found in bivalves from German and French/Belgian/Dutch farms (respectively 0.36 ± 0.07 and 0.2 ± 0.3 particles/g of soft tissues; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015). Mathalon and Hill (2014) found greater quantities (up to 500 times higher) of MPs in the same species from Canada than those previously reported in bivalves from European areas by Van Cauwenberghe and Janssen (2014), Van Cauwenberghe et al. (2015). These discrepant results could be due to the differences in contamination levels between the sites studied. Moreover, as discussed above, the results also depend on the method employed for MP extraction (digestion and filtration) and analysis (microscopy and spectroscopy). The gut depuration step that was performed by Van Cauwenberghe and Janssen (2014), but which is not mentioned in the work of Mathalon and Hill (2014), could lead to differing results, since a decrease of up to 33% in the quantity of MPs in mussels appeared after 3 days of gut depuration (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Comparison between commercial and wild types of mussels (*M. edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) showed that the total number of MPs was not significantly different between the commercial mussels and wild specimens, with values varying from 2.6 to 5.1 fibers (0.2–1.5 mm in length) per 10 g of mussel tissues (De Witte et al., 2014). Regarding another bivalve, 0.47 ± 0.16 particles/g were found in the soft tissue (wet weight) of oysters (*Crassostrea gigas*) (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014) with a decrease of approximately 25% after 3 days of depuration in clean seawater.

In a crustacean (*Nephrops norvegicus*), 83% of the animals sampled in the Clyde Sea contained plastic filaments in their stomach (Murray and Cowie, 2011). In this study, tightly tangled balls of plastics were predominantly found in up to 62% of the

Table 3

Type of organisms, species, type or form and quantity of MPs found in biota with references of the corresponding studies.

Organisms	Species	Microplastics type or form	Quantity	References
Zooplankton	<i>Neocalanus cristatus</i>	Fibers (50%)	0.026 particles/individual	Desforges et al. (2015)
	<i>Euphausia pacifica</i>	Fibers (68%)	0.058 particles/individual	
Polychaete	<i>Clymenella torquata</i>	Fibers	2–8/gram (equal in sediment)	Mathalon and Hill (2014)
	<i>Alitta virens</i>	Fibers	2–8/gram (equal in sediment)	
Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	Fibers	106–178/mussel	Mathalon and Hill (2014)
			0.36 ± 0.07 particles/g	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
			0.2 ± 0.3 particles/g	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Fibers	0.26–0.51/gram	De Witte et al. (2014)
	<i>Crassostrea gigas</i>		0.47 ± 0.16 particles/g	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
Crustacean	<i>Nephrops norvegicus</i>	Filaments	83% had MPs in stomach	Murray and Cowie (2011)
	<i>Crangon crangon</i>	Synthetic fibers	0.68 ± 0.55 MP/g	Devriese et al. (2015)
Thaliacea	<i>Thetys vagina</i>	Fragment, PP/monofilament		Moore et al. (2001)
Fish	<i>Astronesthes indopacifica</i>	Fragments	MPs predominant	Boerger et al. (2010)
	<i>Cololabis saira</i>			
	<i>Hygophum reinhardtii</i>			
	<i>Loweina interrupta</i>			
	<i>Myctophum auro lanternatum</i>			
	<i>Symbolophorus californiensis</i>			
	<i>Merlangius merlangus</i>	Polyamide (35.6%), polyester (5.1%), PS (0.9%), LDPE (0.3%)	32% fish had MPs	Lusher et al. (2013)
	<i>Micromesistius poutassou</i>		51.9% fish had MPs	
	<i>Trachurus trachurus</i>		28.6% fish had MPs	
	<i>Trisopterus minutus</i>		40% fish had MPs	
	<i>Zeus faber</i>		47.6% fish had MPs	
	<i>Aspitrigla cuculus</i>		51.5% fish had MPs	
	<i>Callionymus lyra</i>		38% fish had MPs	
	<i>Cepola macrophthalma</i>		32.3% fish had MPs	
	<i>Buglossidium luteum</i>		26% fish had MPs	
	<i>Microchirus variegatus</i>		23.5% fish had MPs	
Seabird	<i>Puffinus tenuirostris</i>	Fragments	Observation	Tanaka et al. (2013)
	<i>Fulmarus glacialis</i>	Fragments	Observation	Bond et al. (2014)
	<i>Puffinus gravis</i>		Observation	
	<i>Puffinus griseus</i>		Observation	
	<i>Calonectris diomedea</i>	Fragments	Observations	Codina-García et al. (2013)
	<i>Puffinus mauretanicus</i>			
	<i>Puffinus yelkouan</i>			
	<i>Morus bassanus</i>			
	<i>Ichthyophaga audouinii</i>			
	<i>Ichthyophaga melanocephalus</i>			
	<i>Larus michahellis</i>			
	<i>Rissa tridactyla</i>			
Mammalia	<i>Catharacta skua</i>			
	<i>Phoca vitulina</i>		11.2% seal had MPs in stomach	Bravo Rebolledo et al. (2013)
			1% seal had MPs in intestine	
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	PE (56.3%)	16 MPs in gastrointestinal	Besseling et al. (2015)

animals, and there were no significant differences in plastic load between males and females. Devriese et al. (2015) found fibers in 63% of the shrimp studied (*Crangon crangon*), with an average value of 0.68 ± 0.55 MP/g wet weight.

The only species studied in Thaliacea was the salp (*Thetys vagina*), which presented plastic fragments and PP/monofilaments line firmly embedded in their tissues (Moore et al., 2001).

The same methodology as Moore et al. (2001) was used by Boerger et al. (2010) to determine the quantity of MPs in the guts of various common planktivorous fish from the North Pacific Central Gyre. About 35% of the sampled fish contained MPs in their guts (N = 670, 6 different species). The average number of MPs was 2.1 ± 5.78 pieces/fish. Furthermore, these authors showed that there was a positive correlation between size class of fish and quantity of MPs in the guts. The presence of MPs in the gastrointestinal tracts of pelagic and demersal fish from the English Channel was also investigated by Lusher et al. (2013). The authors studied 10 different species (5 pelagic and 5 demersal fish;

N = 504). A proportion of 36.5% (184/504) of fish contained MPs in their gastrointestinal tracts. The average number of pieces of plastic per fish was 1.90 ± 0.10 (351 pieces in 184 fish). Among the total of 351 plastic pieces 92.4% were MPs. There were no differences between pelagic and demersal fish.

MPs were also found in many species of seabirds (Bond et al., 2014; Codina-García et al., 2013; Tanaka et al. 2013).

Bravo Rebolledo et al. (2013) showed that younger animals *phoca vitulina* accumulated greater quantities of MPs compared to older ones, and MPs were found mainly in the stomach (11.2%; N = 107) and the intestines (1%; N = 100) but not in the feces (N = 125).

Very recently, MPs were observed in the intestines of baleen whales (*Megaptera novaeangliae*), a macro-filter-feeder (Besseling et al., 2015). A total of 45 particles were extracted from their intestines; 16 particles were identified as MPs of many different types: PE, nylon, PP etc. Among them, the most abundant type (56.25%) was PE, which is the most widely produced polymer

worldwide, and also the most frequently used in fishing gear.

2.4. Characterization and identification of MPs in field samples

The nature and quantities or concentrations of MPs were not systematically determined in field samples (Tables 1–3) due to the fact that improved identification of MPs from environmental samples requires several steps and demands mastery of several techniques. This is particularly the case for MPs from marine organisms. Differences in MP distribution due to changes of analytical procedure from extraction to visual sorting and identification by spectroscopy have previously been discussed in the literature (Rocha-Santos and Duarte, 2015). However, as shown in Tables 1 and 2, once when identification was carried out, PE fragments were clearly shown to be the most frequently present polymer in both waters and sand/sediment samples. Seawater samples usually contained greater proportions of low density polymers such as PE and PP as has been reported in many studies (Law et al., 2010; Moore et al., 2001; Reisser et al., 2013; Van Cauwenberghe et al., 2015). Surprisingly enough, in sediment samples some studies have also reported high proportions of PE and PP in the whole MPs detected whereas their density in water is lower (Carson et al., 2011; Gregory, 1977, 1983; Khordagui and Abu-Hilal, 1994; Ng and Obbard, 2006; Turner and Holmes, 2011; Van Cauwenberghe et al., 2015; Vianello et al., 2013). This observation tends to support the hypothesis of increased MP density by colonization of a wide range of organisms (micro-organisms, algae, invertebrates etc.) and sorption of organic pollutants. In other studies, MPs with high density (higher than seawater) were present in a more sizable proportion in sand/sediment samples compared to the water column (Browne et al., 2010; Claessens et al., 2011; Lee et al., 2013). Browne et al. (2010) showed that PVC represented 26%, polyester 35%, polyamide 18% of the MPs found in sediment samples. Claessens et al. (2011) also showed that PVC, polyester and polyamide comprised 80% of the total MPs in sediment samples from Belgian coastal areas. Lee et al. (2013) found that more than 96% of the plastic debris on beaches of Korea were Styrofoam (expanded PS) originating in oyster aquaculture facilities near the sampling sites and being used to sustain buoyancy with oyster growth, thereby showing that the nature and concentration of MP may also be dependent on the presence of industries in the vicinity of the sampling site. For deep-sea sediment samples, an average proportion of 53.4% for plastic fibers (polyester) was reported by Woodall et al. (2014) in the Northeast Atlantic Ocean, Southwest Indian Ocean and the Mediterranean Sea.

Considering their forms, plastic fragments were predominant in most of the studies in water and sand/sediment samples (Doyle et al., 2011; Eriksen et al., 2013; Ivar Do Sul et al., 2009, 2013; Law et al., 2010; McDermid and McMullen, 2004; Moore et al., 2002). Nevertheless, in some cases, other forms such as fibers and/or filaments were detected depending on the sampling method, the method of analysis, and the specific objective of the studies (Collignon et al., 2012; Desforges et al., 2014; Gregory, 1983; Lusher et al., 2014; Thompson et al., 2004; Woodall et al., 2014 and Zhao et al., 2014). Concerning MPs detected in organisms, the form was shown to depend upon animal with several observations of filaments/fibers in species from zooplankton to Thaliacea and of fragments in species from fish to mammals (Table 3).

Concerning the size of MP, Morét-Ferguson et al. (2010) reported that 60% of the plastic debris sampled within the North Atlantic subtropical gyre are 2–6 mm long. In addition, the change of size and abundance of MPs between the 1960–1970s and the 1980–1990s was studied by Thompson et al. (2004) who observed decreased size parallel to increased abundance, suggesting a phenomenon of fragmentation. As for Lee et al. (2013), they showed

that MP abundance depended on season with a threefold increase after as compared with before the rainy season, an increase suggesting a more intense fragmentation of MPs by the high physical energy appearing during typhoons.

Interspecies differences (e.g. specific biological barriers), means of exposure and MP abundance, type, size and form present in the field (water and sediment) evidently lead to different bio-accumulations. For example, some species filter what they ingest; others choose MPs according to their size, color etc. due to their resemblance to their usual food (Boerger et al., 2010). Moreover, depending on the object studied (organisms, water or sediment), the MPs under consideration are not the same. In organism studies, focus has typically been placed on small MPs like filaments, largely because they were the ones most widely found. In environmental studies, focus on bigger MPs has been easier with the use of manta nets or water filtration techniques with large pore sizes (>330 µm) to prevent clogging. Lots of MPs present in the environment have not been observed in organisms because they did not pass through the biological barriers or due to the egestion of the organisms; this phenomenon has been reported in many studies (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Mathalon and Hill, 2014). Consequently, the link between what is found in organisms and what is found in the environment is complex.

Many different analytical techniques are currently used to assess the composition and concentration of MPs; they include Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR, Thompson et al., 2004; Vianello et al., 2013; Nor and Obbard, 2014), Raman spectroscopy (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014, 2015) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Pyr-GC-MS, Fries et al., 2013; Dekiff et al., 2014). Their principles are different hence the results may differ as well. As regards MPs in marine wildlife, the use of chemical digestion for extraction from organisms has seemed to influence results. For example, nitric acid extraction efficiency depends on MP sizes and natures. Efficiency is 30% higher for particles of 30 µm compared to 10 µm particles whereas the nylon rope fibers are not extracted (Claessens et al., 2013). There is consequently an urgent need for standardization of the methods for collection, extraction and analysis of MP contamination in the field and animals.

3. Exposure experiments in the laboratory

Over recent years, experimentations designed to assess the ingestion and biological effects of MPs have been carried out on many species, ranging from zooplankton to birds (Table 4). The highest number of studies have involved polychaetes (only one species: *Arenicola marina*) and crustaceans whereas zooplankton has been the most widely investigated in terms of number of species. Concerning the type of MPs used in exposure experiments, the majority of the studies have been performed with PE or PS and, exceptionally, with PVC and PP. Most of the time, the shapes of MPs were spherical since the sphere, often known as a microbead, is the most commonly commercialized shape. The size of the MPs has depended on the study under consideration as well as the concentrations/quantities of MPs introduced in exposure media. The concentrations/quantities used for exposures are very variable and tend to be expressed in different units, leading to difficulties for further comparisons. For example, the units employed have been particle number/medium volume, particle mass/medium volume, particle number/organism number, particle number/sediment mass, etc. Exposure time has also greatly varied, ranging from 4 h to 2 months. Consequently, in addition to the above-mentioned difficulty arising from the use of different unit expressions of MP quantities, variations in MP sizes, quantities and exposure times have led to highly problematic comparisons between the results of

Table 4

Type of organisms, species, type, form and concentrations/abundance of MPs as well as time conditions of laboratory exposures with references of the corresponding studies.

Organisms	Species	Microplastics(MPs) Type* or form	MP Concentrations/abundance	Exposure time	References
Zooplankton	<i>Marenzelleria spp</i>	PE sphere 10 µm	1000–10000 particles/mL	12 h	Setälä et al. (2014)
	<i>Acartia spp</i>				
	<i>Limnocalanus macrurus</i>				
	<i>Eurytemora affinis</i>				
	<i>Synchaeta spp</i>				
	<i>Tintinnopsis lobiancoi</i>				
	<i>Neomysis integer</i>				
	<i>Mysis relicta</i>				
	<i>Mysis mixta</i>				
	<i>Bosmina coregoni</i>				
	<i>nordmannii</i>				
	<i>Evadne nordmannii</i>				
	<i>Oxyrrhis marina</i>	PS 7.3–30.6 µm	635–3000 beads/mL	24 h	
	<i>Doliolidae</i>				
	<i>Euphausiidae Obelia sp</i>				
	<i>Siphonophorae</i>				
	<i>Bivalvia</i>				
	<i>Brachyura</i>				
	<i>Caridea</i>				
	<i>Paguridae</i>				
	<i>Porcellanidae</i>				
Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	HDPE 0–80 µm no additive	2.5 g/L	96 h	Von Moos et al. (2012)
		PS 3–9.6 µm	42 particles/mL	To 48 days	
		PS 0.5 µm	50,000,000 particles/mussel	1 h	
		PS microsphere (10–90 µm)	110 particles/mL	14 days	
Polychaeta	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	PE and PS (0.1–1 mm)	MP = 200–260 ng/g	7 days	Avio et al. (2015)
	<i>Arenicola marina</i>	PS sphere (400–1300 µm) pre-equilibrated with PCBs	0, 0.074, 0.74 and 7.4% dry weight	28 days	
		PVC pre-equilibrated POPs (NP*, Phe*, PBDE*, Triclosan)	PVC 5% in sand	10 days	
		PE pre-equilibrated with Phe	Lower ratio in sediment		
		MP 20–2000 µm	1.5 mg MP/individual	Few days	
		PS microsphere (10–90 µm)	110 particles/g sediment	14 days	
		PVC 130 µm	0–5% in sediment	48 h	
		MP collected on beach	16.7 g/L	4 h	
		PVC (fragment and pellet), Nylon <5 mm			
Echinodermata	<i>Holothuria floridana</i>	PE	solution MP/solution exposure: 20%	24 h	Nobre et al. (2015)
	<i>Holothuria grisea</i>				
	<i>Thyonella gemmata</i>				
	<i>Cucumaria frondosa</i>				
	<i>Embryo of Lytechinus variegatus</i>				
	<i>Centropages typicus</i>	PS 7.3–30.6 µm	635–3000 beads/mL	24 h	
	<i>Calanus helgolandicus</i>				
	<i>Acartia clausi</i>				
	<i>Temora longicornis</i>	PS 0.4–30.6 µm	635–1,000,000 beads/mL		
	<i>Allorchestes Compressa</i>	PE 11–700 µm	0.1 g MP/individual	72 h	
Crustacean	<i>Orchestia gammarellus</i>	MP 20–2000 µm	1 g MP/individual	Few days	Thompson et al. (2004)
	<i>Semibalanus balanoides</i>		1 g MP/1 lit/10 individual		
	<i>Nephrops norvegicus</i>	PP rope	Eat fish pre-contaminated with MP	24 h	
	<i>Carcinus maenas</i>	PS 0.5 µm	Eat mussels pre-contaminated with MP	To 21 days	
	<i>Calanus helgolandicus</i>	PS 20 µm	75 MP/mL	24 h	
	<i>Pomatoschistus microps</i>	PE 420–500 µm	7 types of prey	24 h	
		PE 1–5 µm	18.4–184 µg/L	To 96 h	
	<i>Oryzias latipes</i>	LDPE <0.5 mm	10% of their prey	2 months	
Seabird	<i>Calonectris leucomelas</i>	PE coastal	1.3–1.4 g/bird	To 42 days	Teuten et al. (2009)

(*): HDPE: High Density Polyethylene; LDPE: Low Density Polyethylene; NP: Nonylphenol; PBDE: Polybrominated diphenyl ether; PE: Polyethylene; Phe: Phenanthrene; PS: Polystyrene; PVC: Polyvinyl chloride.

different studies. Most works have focused on the ingestion and biological effects of MPs after laboratory exposure of animals. Nevertheless, in some studies trophic transfer has been studied with regard to exposure of organisms to preys previously contaminated with MPs (Farrell and Nelson, 2013; Murray and Cowie, 2011).

3.1. Ingestion of MPs by organisms

All of the results of marine organism exposures to MPs, from zooplankton to birds, highlight some common trends. The ingestion of MPs has depended on several different factors.

The first factor is the influence of the species studied. For example, concerning zooplankton, several species originating from the Baltic Sea were collected and their capacity of MP ingestion was

tested by Setälä et al. (2014). These authors exposed 11 species to 10 µm fluorescent PS microspheres at 3 concentrations (1000, 2000, 10,000 particles/mL) during 12 h. While 9 out of the 11 species ingested MPs, appreciable differences in the percentages of MP ingestion were observed. The highest percentage with ingested spheres was found in the pelagic polychaete larvae, *Marenzelleria* spp. In another study (Cole et al., 2013), 15 zooplankton taxa, which are representative of abundant mesozooplankton from Northeast Atlantic coastal systems, were collected in Plymouth, UK. PS spheres were chosen in the size range of 7.3–30.6 µm for the purposes of laboratory exposure during 24 h. Their concentrations ranged from 635 to 3000 beads/mL, inversely correlated to the size of the beads. As a result, 13 out of 15 exposed species showed MP ingestion at different proportions depending on taxa. Graham and Thompson (2009) studied four species of deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (*Holothuria floridana*, *Holothuria grisea*, *Thyonella gemmata* and *Cucumaria frondosa*) exposed to PVC pellets (4.0 mm) and showed that the large size of the pellets likely prevented the two smallest species (*Thyonella gemmata* and *H. floridana*) from ingestion, thereby suggesting that feeding capacity could depend on species size.

Intra-species differences could also be a factor influencing the ingestion of MPs. Farrell and Nelson (2013) exposed *M. edulis* to fluorescent PS microspheres of 0.5 µm for 1 h (411 million particles for 8 mussels × 3 replicates). In 13 out of 24 mussel organisms, the microspheres were sufficiently numerous to be visible to the naked eye when cut open. Moreover, for seabirds (*Calonectris leucomelas*, *Procellaria aequinoctialis*), ingestion of MPs was demonstrated by Ryan and Jackson (1987) and Teuten et al. (2009). Age appeared to be a major factor in the contamination by MPs since young and immature birds were more highly contaminated than older ones. Nevertheless, the author did not find any hypothesis supporting this observation (van Franeker and Law, 2015).

In addition to inter- and intra-species differences, another factor influencing ingestion could be MP size. Cole et al. (2013) showed that at both life-stages, adult and juvenile, the Holoplankton *Calanus Helgolandicus* ingested MPs of 20.6 µm while the Holoplankton *Acartia clausi* adults ingested MPs 30.6 µm MPS but not 20.6 µm MPs. Browne et al. (2008) showed that the accumulation of smaller particles (3 µm) by *M. edulis* was superior to 60% compared to larger particles (9.6 µm), in accordance with results from Van Cauwenberghe et al. (2015) who carried out mussel exposures to PS of three different sizes (10, 30, 90 µm). As a result, the accumulation in the tissues of lugworms of 10 µm particles was greater than 30 µm particles whereas no accumulation was shown for 90 µm particles.

Type of MP is also likely to affect MP ingestion and could be an influencing factor. The four species of deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (*H. floridana*, *H. grisea*, *T. gemmata* and *C. frondosa*), studied by Graham and Thompson (2009) were exposed during 4 h of daylight to three types of plastic: PVC fragments (0.25–15 mm long, most of them smaller than 5 mm), nylon fragments (0.25–15 mm long, 0.27 mm in diameter), and PVC pellets (4.0 mm in diameter) all of them collected along the east coast of the USA from Florida to Maine. All of the species ingested MPs in variable proportions. The researchers observed significantly more sizable ingestion of nylon and PVC fragments than pellets (2–138 fold), suggesting selective ingestion by organisms.

Only one study has examined the effect of MP color after laboratory exposure and it seemed, in this case, that it was a factor relevantly influencing MP ingestion. Juvenile fish *Pomatoschistus microps* were exposed during 24 h to PE microspheres (420–500 µm, 3 colors: white, black and red) (De Sa et al., 2015). The authors observed preferential ingestion of white as opposed to blue or red MPs. They then went on to suggest that MPs could be

confused with food.

Most of the time, when ingested MPs have been localized within an organism, the digestive tract has been mentioned, according to a study of Von Moos et al. (2012) that highlighted the presence of HDPE (0–80 µm) in the digestive system of *M. edulis* after 3 h of exposure. Concerning other animals, two filter-feeder species, the barnacle *Semibalanus balanoides* and the amphipod *Orchestia gammarellus* from intertidal habitats close to Plymouth (UK) were exposed to MPs (20–2000 µm) at high concentrations (1 g MPs/L of seawater/10 individuals and 1 g MPs/individual respectively) for a few days (Thompson et al., 2004). Microscopic observation revealed the presence of MPs in the intestinal tracts of both species.

As mentioned above, several factors were identified as having or not having an impact on MP ingestion by organisms, e.g. inter- and intra-species differences, size, type and color of MPs. Combinations of these factors probably occur, which renders it difficult to fully comprehend MP ingestion. Nevertheless, after ingestion by organisms, MPs can potentially be transported in the whole body, leading to the biological effects investigated in exposure studies (Table 4) and discussed in the following section.

3.2. Biological effects

The biological effects of MPs have been explored in different invertebrate and vertebrate species after laboratory exposures (Von Moos et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Cole et al., 2013, 2015). Among the different biological effects, mortality rate, energy budget, loss of weight, feeding activity, embryonic development, predation, biomarker responses and alteration of gene expression have been the most investigated.

The hypothesis that MPs are taken up into cells and can cause significant effects on tissue and at the cellular level was corroborated by Von Moos et al. (2012) in mussels (*M. edulis*). Through the exposure of mussels to high-density additive-free polyethylene (HDPE), with non-uniformly shaped grains ranging from 0 to 80 µm and at a nominal concentration of 2.5 g/L, MPs led to uptake in gills followed by transport towards the stomach and the digestive gland, where accumulation occurred in the lysosomal system after 3 h (Von Moos et al., 2012). In this study, pronounced destabilization of lysosomal membrane and strong inflammatory responses were shown to occur when exposure time was increased. Browne et al. (2008) showed in mussels (*M. edulis*) that while ingestion and translocation of MPs did not change the phagocytic activity, it increased immune response. Concerning fish, specimens of *Pomatoschistus microps* were exposed to PE microspheres (1–5 µm) at concentrations ranging from 18.4 to 184 µg/L (Oliveira et al., 2013). After 96 h of exposure, a reduction of acetylcholinesterase (AChE) activity had been shown to occur. In contrast, no significant effect of PE was found for glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation. Rochman et al. (2014) mixed low-density PE and preys of another fish species (*Oryzias latipes*) at a high proportion (up to 10% of the prey species) during 2 months. Several negative effects appeared: down regulation of choriogenin, vitellogenin and estrogen receptor (ERα) mRNA gene expression and abnormal germ cell proliferation. Severe glycogen depletion and fatty vacuolation were also observed. In the long term, a potential increase of mortality due to the effects observed at molecular level is still under debate. For example, Rochman et al. (2013, 2014) showed a mortality rate reaching 6% and probably associated with the effects observed at the molecular level. In contrast, Browne et al. (2008) showed that in mussel (*M. edulis*), exposure to PS microspheres did not affect their viability.

The survival of organisms is also ensured by other processes and can be impaired by a modified energy budget. While Van Cauwenberghe et al. (2015) did not measure any changes in the

energy budget of mussels (*M. edulis*) ingesting PS microspheres, an increase of energy consumption in the digestive gland (25%) was nonetheless observed. At high concentrations of exposure (up to 5% by weight, in sediment), Wright et al. (2013) showed a depletion of energy reserves (up to 50%) in lugworms (*Arenicola marina*), after 10 days of exposure, whereas despite longer exposure time (up to 14 days), Van Cauwenberghe et al. (2015) showed no depletion of energy reserves for this species at low concentrations. An energy budget depends not only on energy consumption but also, at a higher (eco)toxicologic level, on feeding activity. In one example, the impact of MPs on copepod (*Centropages typicus*) feeding activity was investigated by Cole et al. (2013, 2015). A significant decrease of algal feeding was shown under different conditions of MP exposure (>4000 beads of PS 7.3 μm /24 h and 75 beads of PS 20 μm /24 h, Cole et al., 2013, 2015 respectively). For lugworms (*Arenicola marina*) exposed to MPs, a reduced feeding activity was likewise shown in two different studies (Besseling et al., 2013; Wright et al., 2013). Concerning some vertebrate species, predation can also be studied. De Sa et al. (2015) showed that predation of a fish species (*Pomatoschistus microps*) and its efficiency were reduced by 65% and 50% respectively in the presence of PE microspheres with a diameter of 420–500 μm and different colors. A loss of weight in *A. marina* was indeed observed when MP concentration increased in exposure media (Besseling et al., 2013). Consequently, we could assume that the reduction of predation as well as the abundance of MPs in the media modify energy consumption, which is directly linked to the energy budget and loss of organism weight, which could lead to reduce predation, thereby completing a cycle.

At the ecological level, population survival was demonstrated to be dependent upon organism survival, reproductive efficiency, embryonic development, etc. These endpoints were investigated in the following three studies. Although there was no significant effect of MP exposure on production rates and egg size of the copepod (*Centropages typicus*), following exposure to MPs the hatching of eggs seemed depleted (Cole et al., 2013, 2015). The toxicity of PE on the embryonic development of an Echinodermata (*Lytechinus variegatus*) was also demonstrated by Nobre et al. (2015). After 24 h of exposure, PE pellets had negative effects on embryonic development, which was assessed in terms of the presence of abnormal embryos.

3.3. Trophic transfer

In addition to MP exposure from the media, trophic transfer has been studied in works involving different levels of the food web. The aim of these studies was to highlight MP intakes occurring through diet in addition to ingestion from the media (water and sediments). Trophic transfer is a process leading to a potential human health risk because humans are at the top of the trophic chains and consequently have got to be taken into account in research studies.

Potential MP transfer via planktonic organisms to a higher trophic level was indicated by MP observations in *Mysida* intestine after 3 h of incubation with mesozooplankton previously exposed to PE microspheres (Setälä et al., 2014).

Farrell and Nelson (2013) observed MP trophic transfer from mussels to crabs. *M. edulis* were exposed to 0.5 μm fluorescent PS microspheres (411 million particles for 8 mussels) during 1 h. After that, their tissues were cut and placed in a bucket with crabs (*Carcinus maenas*). Crabs were sampled from 1 h to 21 days. Microspheres were found in the stomach, the hepatopancreas, the ovary, the gills and the haemolymph of the exposed crabs, in decreasing numbers over the trial period.

Murray and Cowie (2011) worked on the crustacean *N. norvegicus* originating from the Clyde Sea. After cleaning the guts of

animals for 2 weeks, they were fed with their prey (fish) and pre-exposed with blue propylene rope (5 mm) for 24 h. The authors showed that 100% of the animals fed with plastic seeded fish presented plastics in their stomachs whereas 70% of the control animals contained plastics which they had accumulated prior to being captured and had not digested during the 2-week starvation period prior to the experiment. These results could be worrisome since this species has a strong socio-economic interest and is consumed by humans.

Another edible species was studied by Desforges et al. (2015), who estimated that consumption of the MPs contained in zooplankton led to the ingestion of 2–7 MP particles/day by members of the juvenile salmon species (*Oncorhynchus* spp.) from coastal British Columbia, and ≤ 91 MP particles/day in returning adults.

Finally, Van Cauwenberghe and Janssen (2014) estimated that annual dietary exposure for European shellfish consumers can reach 11,000 MPs per year. These results pose a challenge about consequences on human health.

4. Discussion

4.1. Are experimental laboratory exposures consistent with the exposome?

Many studies have focused on the MPs found on the field. Given the constraints associated with the sampling protocols, sample treatments and analytical methods, these field studies are hardly comparable. In this part, the results on MPs from field studies will be compared when possible with the conditions used for laboratory exposures, in order to determine the degree of consistency between laboratory exposure and field exposome. Table 5 is a comparative table to summarize the differences between the MPs found in the field and those used in laboratory exposures.

Concerning MPs in water, field concentrations expressed in particles/km² cannot be used for comparison with laboratory exposure, which is usually expressed as particles/medium volume, particle mass/medium volume, particle number/organism number, and particles/sediment mass. Only the expression of field concentrations in particles/m³ can be compared to exposures expressed in particles/medium volume. The range found in the field was 0.004–9200 particles/m³ (Table 1). In laboratory exposures, the contamination range expressed in particles/mL was 42 to 10,000 corresponding to 42 million to 10 billion particles/m³. Comparing these values, it is obvious that the concentrations were not of the same order of magnitude, the lowest concentration of exposure being about 4500 times greater than the highest field concentration.

In the literature, few works have studied the accumulation and effect of MPs on organisms after sediment exposures. The reported MP exposure concentrations were 5% in mass of sand (Browne et al., 2013), up to 5% in mass of sediment (Wright et al., 2013) and 110 particles/g of sediment (Van Cauwenberghe et al., 2015). In field studies, a majority of concentrations were expressed as particle number per m³, m² or L, rendering impossible any comparison with the concentrations usually employed in laboratory exposures. Some field MP concentrations were expressed in particle number/kg of sediment with values ranging from 0.3 to 8000 corresponding to 0.0003 to 8 particles/g (Table 2). This value is more than 10 times below the concentration employed by Van Cauwenberghe et al. (2015). Only one study on natural sediments from the Indian Ocean (Reddy et al., 2006) has expressed the concentration as 81.43 mg/kg, corresponding to 0.0081%, which was about 600 times lower than the concentrations used by Browne et al. (2013) and Wright et al. (2013) in laboratory exposures.

Table 5
Overall comparison of the MPs found in waters and sediments with the different MPs used for laboratory exposures. The number of references citing this type or size or nature of MP as predominant is indicated in brackets. In gray: PVC; in black: PE; in blue: PP; in yellow: PS.* identification of MP nature was not performed in all references.

	Compartment	Type	Size	Nature	Concentration	
In the field	Water (25)	Fragments predominant (16/25)	> 330 µm	PE, PP, PS (6/25*)	0.004 to 9200 particles/m ³	
	Sediment and sand (27)	Fragments predominant (15/27)		PE (10/27*)	0.3–2175 particles/kg	
Laboratory exposures	Water (24)	Beads, spheres (21/24); MPs from environment (3/24)	500 nm to 2 mm; < 100 µm (15/25)	PS, PE, PVC (21/25)	42.10 ⁶ to 1.10 ¹² beads/m ³	
	Sediment (1)	Spheres	130 µm	PVC	110 particles/kg	

When mentioned (in 6 out of 25 studies), the type of MPs found in natural waters was PE and at times additional PP or PS. All of the waterborne exposure studies were conducted with PE or PS, with some exceptions for PVC and PP, which seems to be consistent with the field. As regards the MP types found in sediment field samples, despite their low density, PE was widely predominant when the MP type was mentioned, and was also sometimes associated with PP, PVC and PS. The polymers used for sediment exposures were PVC or PS, which do not predominate in the field. In laboratory exposures, even when the choice of polymers was consistent with those found in the field, medium contaminations were usually carried out with only one type of polymer, whereas the MPs present in the field are known to be a mix of many types of plastic. Nevertheless, the justification for use of PE or PS in laboratory exposures could be that they represent 36% of total production of plastics (Andrady and Neal, 2009). Moreover, PVC is likely to have been used in sediment exposures because it is denser than water and consequently flows and accumulates in sediment. As mentioned above, while PE with low density can be found in field sediments due to the colonization of organisms and adsorption of compounds, it remains difficult to mimic the phenomenon in laboratory experiments. The use of low density PE for sediment exposure would lead to transfer of MPs from the sediment to the water column, which could modify exposure modalities.

Whether the exposure studies were for waterborne or sediment-containing environments, in terms of forms most of the time the MPs employed for exposures, were commercialized microspheres with precise and regular sizes whereas in the field, the reported MPs presented high polydispersity in size with various irregular forms, such as fragments, fibers or filaments. These microspheres can mimic the primary MPs but not the secondary MPs that are predominant in the environment.

In order to take into account these numerous and important differences between exposure conditions and exposome, some authors (Graham and Thompson, 2009; Nobre et al., 2015) have used MPs extracted from environmental samples to carry out medium contaminations. In their findings, MPs from marine samples were more in line with exposome, i.e., MPs with a variety of types and of various sizes as well as irregular and different forms.

Moreover, as previously mentioned, MPs from marine environments could be colonized by organisms and constitute the sorption support for many organic compounds present in the environment, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorines (DDEs) ... To mimic organic compound sorption, Rochman et al. (2014) deployed PE pellets in marine areas during 3 months to obtain MPs more similar to those found in the environment. In addition, the levels of plastic additives, like phthalates or bisphenol A, in MPs found in the environment should be lower than commercialized plastic polymers since the time spent in marine water is likely to lead to a desorption of these compounds. In contrast, commercialized polymers are likely to contain higher levels of additives, except if they are polymers without additives, which are not currently commercially available in microsphere shapes.

4.2. Do the toxicity effects reported on a wide range of aquatic organisms, exposed to MPs in laboratories reflect environmental reality?

It remains difficult to conclude that experimental exposures are likely to mimic environmental conditions in terms of MP contamination. Since laboratory MP contaminations are not always consistent with environmental conditions the toxicity effects observed on organisms exposed to MPs in laboratory cannot reflect the reality encountered in the field.

All the laboratory experiments were performed with MP concentrations in greater orders of magnitude than those found in the field in order to depict the associated toxicity mechanisms. Consequently, the ingestion and associated effects observed in organisms corresponded to highly pronounced contaminant stress. Studies employing environmental MP levels are challenging since the available analytical tools do not yet permit identification of the biological effects occurring at low concentrations of exposure. However, in the next decades environmental MP loads are not likely to decrease since plastic, with its numerous advantages, is more and more massively used. In this context, the study of biological impacts on organisms after exposure to high concentrations of MP may be of considerable interest.

In addition to the problems associated with highly variable MP concentrations, it is difficult to differentiate and separately measure the mechanical and the chemical effects of MPs on organisms. It would be interesting to determine whether the toxicity effects are due to the presence of particles or else related to the polymer nature or to the MP size and form. For example, Avio et al. (2015) showed that the majority of the observed biological variations on exposed organisms (immunological, lysosomal, cholinesteratic and antioxidant effects) were not influenced by the type of polymer (PE vs PS). In order to determine the mechanical effects, the use of particles similar to MPs in laboratory exposures, except in their nature (glass particles for example), could be useful.

As it is now well-established that MPs play the role of vectors of organic compounds such as plastic additives or organic pollutants, to marine organisms (Teuten et al., 2007; Browne et al., 2013; Besseling et al., 2013), so as to create more environmentally realistic conditions, a few impact studies have used MPs associated with organic pollutants. The organic compounds include non-ylphenol, triclosan, pyrene, polybromodiphenylethers (PBDEs), PAHs, PCBs (Browne et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Chua et al., 2014; Avio et al., 2015) which are known to cause toxic effects by themselves (Meeker et al., 2009; Oehlmann et al., 2009; Talsness et al., 2009; Vidal-Linan et al., 2015). Consequently, the presence of these compounds in MPs generated an additional effect, rendering it difficult to determine from where the toxicity arises. As a result, most studies have tried to differentiate the effects of the MPs from the effects of sorbed organic compounds through exposure experiments performed with MPs mixed or not mixed with organic compounds. In general, in these studies the different organisms exposed to virgin or contaminated MPs exhibited different effects, [lugworms (*Arenicola marina*), mussels (*M. galloprovincialis*), common goby (*Pomatoschistus microps*)], suggesting that impacts were induced by physical ingestion of the particles and the chemical toxicity of the adsorbed organic compounds.

In the case of Rochman et al. (2013, 2014), they used virgin pellets and pellets previously deployed during 3 months in marine urban areas for exposure to Japanese medaka (*O. latipes*). They reported that in a marine environment, PE MPs sorbed environmentally relevant concentrations of contaminants. They also found effects on gene expression (down-regulation of choriogenin) in males exposed to marine-plastic treatment, whereas gene expression (down-regulation of vitellogenin, choriogenin and the estrogen receptor) was altered in female fish exposed to both marine- and virgin-plastic treatment, suggesting that the ingestion of these plastic debris (and the associated chemical pollutants) at environmentally relevant concentrations may alter endocrine system function in fish.

In order to ensure more environmentally representative studies, the toxicity of two different types of PE, i.e., virgin or beach-stranded plastic pellets, on the embryonic development of an Echinodermata (*L. variegatus*) were studied by Nobre et al. (2015). The toxicity of stranded pellets was found to be lower than that of virgin pellets. As shown by Rochman et al. (2013, 2014), pellets from beach had greater concentrations of hydrophobic pollutants than did virgin pellets. Nevertheless, the authors suggested that plastic pellets acted as a vector of pollutants, especially for plastic additives found on virgin particles, and also suggested that the toxicity of leached chemicals from pellets could depend on the environmental compartment in which the pellets accumulated. This is the only study highlighting the effects of potential plastic additives, which is obviously highly important. While the choice of the nature of polymer could have no effect as observed by Oliveira et al. (2013), the use of raw polymers with or without additives has to be taken into account when biological effects are studied

through laboratory exposure.

5. Conclusion

There is an urgent need to establish standardized protocols for sampling, sample preparation, MP analysis and data expression so as to facilitate the comparison of field studies. It would be helpful to better define exposome in view of producing laboratory exposure conditions that would be more consistent with the natural environment. Guidelines should also be introduced to better mimic environmental conditions and translate into realistic biological effects. Many investigations have got to be continued: (i) study of organic compound sorption on MPs taking different abiotic factors into account, (ii) mechanical and chemical toxicity evaluation of exposures to MPs associated with to organic compounds under realistic environmental conditions, (iii) evaluation of biological effects after exposure to MPs at different levels of the biological organization using several approaches such as “omic” methods (genomic, transcriptomic, metabolomic), biochemical and behavioral biomarkers. New investigations have also got to be carried on aimed at broadening the MP size ranges studied to “nanoplastics”, which are challenging because of a need for new and more efficient analysis methods. To conclude, MPs toxic for organisms are likely to be present in many marine environments, raising the risk of severe alterations to human health.

References

- Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 364, 1977–1984.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605.
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In: *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris*. NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30. NOAA, p. 530. Silver Spring, September 9–11, 2008.
- Avio, C.G., Gorb, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ. Pollut.* 198, 211–222.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 1985–1998.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 47, 593–600.
- Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 248–252.
- Boerger, C.M., Lattin, G.L., Moore, S.L., Moore, C.J., 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2275–2278.
- Bond, A.L., Provencher, J.F., Daoust, P.Y., Lucas, Z.N., 2014. Plastic ingestion by fulmars and shearwaters at Sable Island, Nova Scotia, Canada. *Mar. Pollut. Bull.* 87, 68–75.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Microplastic – an emerging contaminant of potential concern. *Integr. Environ. Assess. Manage.* 3, 559–566.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3404–3409.
- Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Curr. Biol.* 23, 2388–2392.
- Bravo Rebolledo, E.L., van Franeker, J.A., Jansen, O.E., Brasseur, S.M., 2013. Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands. *Mar. Pollut. Bull.* 67 (1), 200–202.
- Buchanan, J.B., 1971. Pollution by synthetic fibers. *Mar. Pollut. Bull.* 2, 23.
- Carpenter, E.J., Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science* 175, 1240–1241.
- Carson, H.S., Colbert, S.L., Kaylor, M.J., McDermid, K.J., 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1708–1713.
- Chapman, P.M., Wang, F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries.

- Environ. Toxicol. Chem. 20, 3–22.
- Chua, E., Shimeta, J., Nuggeoda, D., Morrison, P.D., Clarke, B.O., 2014. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. Environ. Sci. Technol. 48, 8127–8134.
- Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Mar. Pollut. Bull. 62, 2199–2204.
- Claessens, M., van Cauwenbergh, L., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. Mar. Pollut. Bull. 70, 227–233.
- Codina-García, M., Militão, T., Moreno, J., González-Solís, J., 2013. Plastic debris in Mediterranean seabirds. Mar. Pollut. Bull. 77, 220–226.
- Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. Environ. Sci. Technol. 47, 6646–6655.
- Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, Galloway, T.S., 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. Environ. Sci. Technol. 49, 1130–1137.
- Collignon, A., Hecq, J.H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 64, 861–864.
- Collignon, A., Hecq, J.H., Galgani, F., Collard, F., Goffart, A., 2014. Annual variation in neustonic micro- and meso-plastic particles and zooplankton in the Bay of Calvi (Mediterranean–Corsica). Mar. Pollut. Bull. 79, 293–298.
- Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environ. Monit. Assess. 168, 299–304.
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.A., Irgoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic accumulation in the Mediterranean sea. PLoS One. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121762>.
- De Sa, L.C., Luís, L.G., Guilhermino, L., 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. Environ. Pollut. 196, 359–362.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., Robbins, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. Mar. Pollut. Bull. 85, 146–155.
- Dekiff, J.H., Remy, D., Klasmeier, J., Fries, E., 2014. Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. Environ. Pollut. 186, 248–256.
- Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44, 842–852.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. Mar. Pollut. Bull. 79, 94–99.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast Pacific ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320–330.
- Devriese, L.L., Van de Meulen, M.D., Maes, T., 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Mar. Pollut. Bull. 98, 179–187.
- Doyle, M.J., Watson, W., Bowlin, N.M., Sheavly, S.B., 2011. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. Mar. Environ. Res. 71, 41–52.
- Engler, R.E., 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302–12315.
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar. Pollut. Bull. 68, 71–76.
- Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environ. Pollut. 177, 1–3.
- Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374–2379.
- Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Mar. Pollut. Bull. 85, 156–163.
- Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. Environ. Sci. Processes Impacts 15, 1949–1956.
- Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. Biol. Lett. 8, 817–820.
- Goldstein, M.C., Titmus, A.J., Ford, M., 2013. Scales of spatial heterogeneity of plastic marine debris in the Northeast Pacific Ocean. PLoS One. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080020>.
- Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 368, 22–29.
- Gregory, M.R., 1977. Plastic pellets on New Zealand beaches. Mar. Pollut. Bull. 8, 82–84.
- Gregory, M.R., 1983. Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and Bermuda. Mar. Environ. Res. 10, 73–92.
- Harrison, J.P., Schratzberger, M., Sapp, M., Osborn, A.M., 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. BMC Microbiol. 14, 232–247.
- Hidalgo-Ruiz, V., Thiel, M., 2013. Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. Mar. Environ. Res. 87–88, 12–18.
- Hidalgo-Ruiz, V., Gutow, L., Thompson, L.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075.
- Ivar do Sul, J.A., Spengler, A., Costa, M.F., 2009. Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). Mar. Pollut. Bull. 58, 1236–1238.
- Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., Barletta, M., Cysneiros, F.J.A., 2013. Pelagic microplastics around an archipelago of the Equatorial Atlantic. Mar. Pollut. Bull. 75, 305–309.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., et al., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771.
- Jayasiri, H.B., Purushothaman, C.S., Vennila, A., 2013. Quantitative analysis of plastic debris on recreational beaches in Mumbai, India. Mar. Pollut. Bull. 77, 107–112.
- Khordagui, H.K., Abu-Hilal, A.H., 1994. Industrial plastic on the southern beaches of the Arabian Gulf and the western beaches of the Gulf of Oman. Environ. Pollut. 84, 325–327.
- Kusui, T., Noda, M., 2003. International survey on the distribution of stranded and buried litter on beaches along the Sea of Japan. Mar. Pollut. Bull. 47, 175–179.
- Laglbauer, B.J.L., Franco-Santos, R.M., Andreu-Cazenave, M., Brunelli, L., Papadatou, M., Palatinus, A., Grego, M., Deprez, T., 2014. Macrodebris and microplastics from beaches in Slovenia. Mar. Pollut. Bull. 89, 356–366.
- Lattin, G.L., Moore, C.J., Zellers, A.F., Moore, S.L., Weisberg, S.B., 2004. A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. Mar. Pollut. Bull. 49, 291–294.
- Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. Science 329, 1185–1188.
- Lee, J., Hong, S., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, Y.C., Jang, M., Heo, N.W., Han, G.M., Lee, M.J., Kang, D., Shim, W.J., 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. Mar. Pollut. Bull. 77, 349–354.
- Lucia, G.A., Caliani, I., Marra, S., Camedda, A., Coppa, S., Alcaro, L., Campani, T., Giannetti, M., Coppola, D., Cicero, A.M., Panti, C., Baini, M., Guerranti, C., Marsili, L., Massero, G., Fossi, M.C., Matiddi, M., 2014. Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). Mar. Environ. Res. 100, 10–16.
- Lusher, A.L., McHugh, M., Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Mar. Pollut. Bull. 67, 94–99.
- Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. Mar. Pollut. Bull. 88, 325–333.
- Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79.
- McDermid, K.J., McMullen, T.L., 2004. Quantitative analysis of small-plastic debris on beaches in the Hawaiian Archipelago. Mar. Pollut. Bull. 48, 790–794.
- Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H., 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2097–2113.
- Mohamed Nor, N.H., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. Mar. Pollut. Bull. 79, 278–283.
- Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K., Weisberg, S.B., 2001. A comparison of plastic and plankton in the north Pacific central gyre. Mar. Pollut. Bull. 42, 1297–1300.
- Moore, C.J., Moore, S.L., Weisberg, S.B., Lattin, G.L., Zellers, A.F., 2002. A comparison of neustonic plastic and zooplankton abundance in southern California's coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 44, 1035–1038.
- Moore, C.J., Lattin, G.L., Zellers, A.F., 2005. A brief analysis of organic pollutants sorbed to pre and postproduction plastic particles from the Los Angeles and San Gabriel River Watersheds. In: Proceedings of the Plastic Debris Rivers to Sea Conference. Algalita Marine Research Foundation, Long Beach, CA.
- Morét-Ferguson, S., Law, K.L., Proskurowski, G., Murphy, E.K., Peacock, E.E., Reddy, C.M., 2010. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. Mar. Pollut. Bull. 60, 1873–1878.
- Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217.
- Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Mar. Pollut. Bull. 52, 761–767.
- Nobre, C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A., 2015. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Mar. Pollut. Bull. 92, 99–104.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsh, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2047–2062.
- Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Ecol. Indic. 34, 641–647.
- Reddy, M.S., Basha, S., Adimurthy, S., Ramachandrabhaiah, G., 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. Estuar. Coast. Shelf Sci. 68, 656–660.
- Reisser, J., Shaw, J., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Proietti, M., Thums, M., Pattiaratchi, C., 2013. Marine plastic pollution in waters around Australia: characteristics,

- concentrations, and pathways. PLoS One. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080466>.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci. Rep.* 3, 3263.
- Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014. Early warning signs of endocrine disruption from the ingestion of plastic debris in the adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Sci. Total Environ.* 493, 656–661.
- Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *Trends Anal. Chem.* 65, 47–53.
- Ryan, P., Jackson, S., 1987. The lifespan of ingested plastic particles in seabirds and their effect on digestive efficiency. *Mar. Pollut. Bull.* 18, 217–219.
- Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 1999–2012.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83.
- Shaw, D.G., Day, R.H., 1994. Colour- and form-dependent loss of plastic microdebris from the North Pacific Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 39–43.
- Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 2079–2096.
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.A., Watanuki, Y., 2013. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Mar. Pollut. Bull.* 69, 219–222.
- Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7759–7764.
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 2027–2045.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304, 838.
- Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S., Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 2153–2166.
- Turner, A., Holmes, L., 2011. Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 377–381.
- Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10–17.
- van Franeker, J.A., Law, K.L., 2015. Seabirds, gyres and global trends in plastic pollution. *Environ. Pollut.* 203, 89–96.
- Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., Da Ros, L., 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: first observations on occurrence, spatial patterns and identification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 130, 54–61.
- Vidal-Linan, L., Bellas, J., Salgueiro-Gonzalez, N., Muniategui, S., Beiras, R., 2015. Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gilla. *Environ. Pollut.* 200, 133–139.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23, 1031–1033.
- Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E., Thompson, R.C., 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. Open Sci.* 1, 140317.
- Yamashita, R., Tanimura, A., 2007. Floating plastic in the Kuroshio current area, western North Pacific ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 485–488.
- Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146.
- Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., Li, D., 2014. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 86, 562–568.



Development and validation of LC–MS methods for peptaibol quantification in fungal extracts according to their lengths



Anne-Isaline Van Bohemen^a, Aurore Zalouk-Vergnoux^{a,*}, Laurence Poirier^a,
Nam Ngoc Phuong^a, Nicolas Inguibert^b, Khoubab Ben Haj Salah^b, Nicolas Ruiz^a,
Yves François Pouchus^a

^a University of Nantes, MMS, EA 2160, F-44000 Nantes, France

^b UPVD, University of Perpignan, CRIODE—USR CNRS 3278, F-66860 Perpignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 21 November 2015

Available online 4 December 2015

Keywords:

Trichoderma sp

Peptaibols

LC/ESI-IT-MS

Quantification

Validation

Biocontrol

ABSTRACT

Some terrestrial *Trichoderma* sp. strains are already used as biological control agents (BCAs). They all produce peptaibols, small antimicrobial peptides which are supposed to play a role in the anti-phytopathogenic activity of *Trichoderma* sp. *Trichoderma* strains producing high amounts of peptaibols could represent new potential BCAs. In this context, marine-derived *Trichoderma* strains from the marine fungal strain collection of the “Mer, Molécules, Santé” (MMS) laboratory were investigated for their peptaibol production. Previously, the quantification of peptaibols was performed using alamethicin, as standard (20-amino acid residues peptaibol). In this study, the development and validation of quantification LC/ESI-TI-MS methods using different standards of peptaibols (11-, 14- and 20-amino acid residues) was performed in order to quantify all of them, in a single analysis, in *Trichoderma* crude extracts according to their chain length. The developed and validated methods were used to study the peptaibol production kinetic of a marine-derived *Trichoderma* strain, i.e., *Trichoderma longibrachiatum* (MMS 151). The results showed the optimal culture time at the 9th day with concentrations reaching $1.4 \pm 0.2\%$ and $2.3 \pm 0.4\%$ of the fungal biomass respectively for 11- and 20-residue peptaibols. Then, the different peptaibol subgroups produced by 13 *Trichoderma* strains were quantified. According to their 18-, 19- and 20-residue peptaibol production, three strains referenced as MMS 1541, MMS 639 and MMS 151 seemed to be good candidates as potential new biological control agents with respective production of 0.4, 0.4 and 2.1%.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last 20 years, the reduction of pesticide uses in crops has become a necessity for health protection and prevention. The search of alternative fungicides for the ornamental plants is becoming strategic. For example, phytosanitary products will be forbidden in the French public green spaces from 2020 (French program Plan Ecophyto 2018: (<http://agriculture.gouv.fr/sections/magazine/focus/phyto-2018-plan-pour/#planECOPHYTO2018>)).

Some terrestrial *Trichoderma* sp. strains are already used as biological control agents (BCAs) [1]. An antagonistic action of these strains was highlighted on several phytopathogens like *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium* or *Botrytis* [2]. *Trichoderma* strains are also used as plant growth-promoting agents. In fact, their use is

recommended for cultivation of vegetables and ornamental plants, for plant and tree nursery and should lead to: (i) prophylactic protection of plants and scions against soil-borne plant pathogenic fungi; (ii) stimulation of root growth, including a higher percentage of root hairs; (iii) increased yield due to improved germination and rooting rates; (iv) increase of plant dry weight and number of flowers; (v) earlier onset of flowering and shortening of cultivation periods [2].

All *Trichoderma* strains produce peptaibols which are small linear antimicrobial peptides, characterized by molecular masses ranging from 500 to 2000 Da, thus containing 5–20 residues and a high amount of α -amino-isobutyric acid (Aib or U) [3]. They possess an acylated N-terminus and a C-terminus amino-acid residue reduced in amino-alcohol [4]. Peptaibols form a subgroup in the larger family called peptaibiotics [3,5,6]. Peptaibiotics have been studied for their potential biological activities particularly in the context of the alternative sources of antibiotics research [7] and as new therapeutic agents [8]. They had been shown to exhibit

* Corresponding author at: Université de Nantes, 44035 Nantes, Cedex 1, France.
E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

a wide range of biological activities including an antibacterial activity against *Gram-positive* bacteria [9–11], as well as dormant mycobacteria [12,13] and an antifungal activity [10]. They have also been widely studied for their potential use as biocontrol agents against plant fungal pathogens [14–16]. They have been reported to have an antiviral activity, particularly against infections caused by the virus of tobacco mosaic [17–19], and an antiparasitic activity against amoebae (*Dictyostelium* sp.) [20] and protozoa (*Plasmodium falciparum*) [21]. Peptaibols are supposed to play a role in the anti-phytopathogenic activity of *Trichoderma* sp. [15,22]. If they are long enough, they are able to form voltage-dependent ion channels in the lipid membranes [23,24]. Consequently, *Trichoderma* strains producing high amounts of long-chain peptaibols (18–20-residues) could represent potential new BCAs. Moreover, peptaibols could have not the same efficiency according to the targeted phytopathogen. It thus necessary to quantified separately each produced peptaibol subgroups in order to select the most efficient *Trichoderma* strain to inhibit the targeted pathogen.

Peptaibols could be classified according to their amino acids chain length and are produced in microheterogenous mixtures. The main subgroups are 11-, 14-, 18-, 19- and 20 amino acid residue peptaibols [25]. Until now, the LC-MS quantifications of peptaibols have been performed using alamethicin, as standard [26,27]. Currently, all peptaibol subgroups (11-res–20-res peptaibols) were quantified using only one standard: the commercial alamethicin mixture. Commercial alamethicin is a mixture of four 20-residue peptaibols, being the only current peptaibol commercialized mixture. Moreover, according to the study from Degenkolb, this commercial mixture contain a mycotoxin: the trichothecene [28]. In the present study a LC/ESI-IT-MS methods was developed using different standards of peptaibols (11-, 14- and 20-residues) to quantify each peptaibol subgroup separately. It seems necessary to use standards with different chain lengths since they probably lead to different ionizations in the mass spectrometer (ESI-IT) and consequently to different sensitivities.

In the present study, after development and validation of the analytical methods of the quantification of the different peptaibol subgroups, 12 marine-derived *Trichoderma* strains of the marine fungal strain collection of the laboratory were screened in order to select the best potential BCAs.

2. Experimental

2.1. Chemical

Dichloromethane (CH_2Cl_2) and methanol (MeOH) used for peptaibol extractions and purifications were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and distilled prior to use. The HPLC quality grade methanol for MS analyses was obtained from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands).

2.2. Peptaibol standards

Alamethicin F50/5, hypomurocin A-III and a bergofungin D analogue were synthesized using microwave-assisted one shot synthesis according to the protocol of Ben Haj Salah and Inguimbart [29]. They are respectively named PEP-20 (20-residue peptaibols), PEP-11 (11-residue peptaibols) and PEP-14 (14-residue peptaibols) in this paper. Hypomurocin A-III (PEP-11) was observed in *Hyprocrea muroina* [30] and the similar sequence of bergofungin D (PEP-14) isolated from *Emericellopsis donezki* [31] contain proline residues in positions 9 and 12 instead of hydroxyproline. Their sequences are:

PEP-11: AcUQVLUPLLUPLol

PEP-14: AcVUUVGLUUPQUUPol

PEP-20: AcUPUAUAQUVUGLUPVUUQQFol

Q = Glutamine V = Valine U = Aib P = Proline L = Leucine A = Alanine Fol = Phenylalaninol Lol = Leucinol G = Glycine.

2.3. Fungal strains

Twelve marine-derived and one commercial strain of *Trichoderma* sp. were selected for this study. Their specificities are given in Table 1. Their qualitative peptaibol productions have been determined using mass spectrometry analyses in infusion mode as described by Carroux et al. [32].

2.4. Culture

Strains were inoculated onto Petri dishes (10-cm diameter) containing 20 mL of DCA medium (Dextrose 40 g/l, enzymatic digest of Casein 10 g/l, Agar 15 g/l, DIFCO, France) prepared with reconstituted seawater. Cultures were incubated in natural light at 27 °C.

2.5. Extraction and purification

After incubation, mycelia and conidia were scraped from the agar surface. The harvested biomass was steeped twice in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 then 2:1 (v/v, 30 mL total volume) for 30 min at room temperature. The combined extracts were filtered, washed with distilled H_2O (20 mL) and evaporated to dryness to provide crude extracts.

2.6. LC-MS analysis

The samples were analyzed using a high performance liquid chromatography (HPLC) system consisting on a spectraSYSTEM P1000XR pump, a spectraSYSTEM AS3000 as autosampler (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a Kromasil-C18 5 μm 250 mm $\times$ 2 mm column (Interchim, France) heated at 40 °C. The autosampler was maintained at room temperature and was programmed to inject 5 μL of sample in the chromatographic column. The mobile phase consisted on a $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (85:15, v/v) in isocratic mode at a constant flow rate of 0.2 mL/min. Mass analyses were performed using a Finnigan Matt LCQTM ESI-IT mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) in positive ionization mode with a capillary temperature of 160 °C, a capillary voltage and a spray voltage of 3 V and 4.50 kV, respectively. Nitrogen flow rates were 60 and 0 (arbitrary units) respectively for sheath gas and auxiliary gas. The parameters of ion optic transmission were 50 V, –3.25 V, –5.5 V and 400 V for tube lens offset, multipole 1 offset, multipole 2 offset and multipole RF amplifier respectively.

Analyzed under neutral conditions and in positive mode by electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry (ESI-IT-MS), long chain peptaibols appear principally as doubly charged sodium adduct ions $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ and short chain peptaibols appear as singly charged sodium adduct ions $[\text{M} + \text{Na}]^+$. All data acquisitions and reprocessings were performed using LCQ Xcalibur 1.3 software (Thermo Fisher Scientific). For each standard, the analyzed ions were:

– PEP-11: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1197$

– PEP-14: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1417$ and $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+} = 720$

– PEP-20: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1985$ and $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+} = 1004$.

Concerning the peptaibols produced by *Trichoderma* sp., the expected diagnostic ions of each subgroup are presented in Table 2.

The short chain peptaibols were quantified using the standard calibration curve performed with PEP-11 and PEP-14 for 11- and 14-residue peptaibols respectively. The long-chain peptaibols

Table 1

Trichoderma strain descriptions, origins and putative peptaibol productions.

Strain	Species	Isolated from	Geographical origin	GenBank accession number	Putative peptaibol subgroups
MMS 13	<i>T. harzianum</i>	Cockles	Le croisic	JQ653065	11-, 18-res
MMS 19	<i>T. citrinoviride</i>	Cockles	Le croisic	JQ608473	11-, 20-res
MMS 58	<i>T. longibrachiatum</i>	Mussels	La tara	JQ653055	11-, 20-res
MMS 151	<i>T. longibrachiatum</i>	Mussels	Tharon	JQ653057	11-, 20-res
MMS 510	<i>T. reesei</i>	Sediment	La couplasse	GU947793	11-, 20-res
MMS 639	<i>T. atroviride</i>	Seawater	La couplasse	JQ653056	11-, 17-, 19-res
MMS 755	<i>T. capillare</i>	Sediment	Le collet	JQ653068	11-, 20-res
MMS 852	<i>T. capillare</i>	Sediment	Port-Giraud	JQ653070	11-, 20-res
MMS 927	<i>T. atroviride</i>	Sediment	Le croisic	GU947796	17-, 19-res
MMS 975	<i>T. ghanense</i>	Sediment	Le croisic	GU947792	11-, 20-res
MMS 1255	<i>T. harzianum</i>	Sediment	Port du bec	JQ653081	11-, 14-res
MMS 1541	<i>T. pleurotica</i>	Cockles	Bonne anse	JQ653064	11-, 14-, 18-res
T22 (ATCC 20847)	<i>T. harzianum</i>	Commercial BCA	–		11-, 14-, 18-res

Table 2Characteristic target [M + Na]⁺ or [M + 2Na]²⁺ ions of peptaibol subgroups.

11-res [M + Na] ⁺	14-res [M + Na] ⁺	17-res [M + 2Na] ²⁺	18-res [M + 2Na] ²⁺	19-res [M + 2Na] ²⁺	20-res [M + 2Na] ²⁺
1141	1465	824	879	963	985
1155	1479	831	882	970	992
1169	1493	832	886	977	999
1183	1506	838	889	984	1005
1197	1520	839	893	991	
1211	1534	845	896	998	
1225		846	900		
		853	903		
			907		
			910		
			914		
			917		
			925		

(17–20-residues) were quantified using the calibration curve performed with PEP-20.

The quantification of peptaibols according to their length in all samples (standards included) were performed in the same conditions and during a single analysis. Nevertheless, the target ions for the quantification of the peptaibols in crude extracts were not the same that the characteristic ions tracked for the standards PEP-14 and PEP-20. On the contrary, the target ion used for the detection of PEP-11 ($m/z = 1197$) was among the target ions analyzed for the 11-residue peptaibol quantification in crude extracts (Table 2). *Trichoderma* sp. strains potentially produce peptaibols which exhibit the same target ion than the synthesized one, PEP-11, even if the sequences are not the same.

2.7. Method validation

The validation process was conducted according to the guidance for industry bioanalytical method validation, recommended by Food and Drug Administration (FDA) [33].

Co-mingled standards (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) were prepared at 6 concentration levels: 0.10; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00 and 1.25 µg/mL with HPLC quality grade methanol. The calibration curves were constructed by plotting the chromatographic peaks area versus the corresponding concentrations. The data were fitted using a linear regression with $1/X^2$ weighting factor.

2.7.1. Specificity

Specificity of the methods was determined by analyzing a methanol sample (neat solvent used for the sample preparation) and by comparing it to a calibration level in order to investigate the potential interferences at the retention times of the standards and naturally produced peptaibols. If there is no interfering peak at the

expected retention times for the selected ions, the specificity of the methods will be validated.

2.7.2. Linearity

The linearity was evaluated from 3 injections of the calibration levels of co-mingled standard solutions. A linear model was applied to the triplicates. For each standard, the slope and the y-intercept of the calibration curve were calculated as well as the coefficient of determination. The linearity was considered as satisfactory when the coefficient of determination (R^2) of the calibration curves was higher than 0.999 for each curve [34]. Then, the variance analysis was also performed to validate the linear models in terms of regression and linearity.

2.7.3. LOD and LOQ

The limits of detection (LOD) were defined for each compound as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio of 3 and was calculated as $3\sigma/S$ (σ is the standard deviation of the linear regression and S the slope of the calibration curve) and the limits of quantification (LOQ) were defined as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio of 10 and calculated as $10\sigma/S$.

2.7.4. Intra-assay precision and accuracy (repeatability)

Three calibration levels (0.50, 0.75 and 1.00 µg/mL) were injected 6 times in a single run. The means, the standard deviations, the coefficients of variation (%CV) and the percent deviations of the back calculated concentrations (%bias) were calculated for each standard level. The coefficients of variation of the six injections of each level were considered as acceptable when inferior to 15%. The back calculated concentrations of each level had to be within 15% deviation from the nominal value.

2.7.5. Inter-assay precision and accuracy (reproducibility)

The inter-group accuracy and precision were determined by the injection of a calibration curve per day, at three different days. Each calibration curve was composed of the 6 concentration levels. The means, the standard deviations, the coefficients of variation (%CV) and the percent deviations of the back calculated concentrations (%bias) were calculated for each standard level. The coefficient of variation of the 3 injections of each level should be inferior to 15%. The back calculated concentration of each level had to be within 15% deviation from the nominal value.

2.7.6. Matrix effect

Crude extracts of *Trichoderma longibrachiatum* (MMS151) were spiked before LC/MS analyses with different concentrations of standard solutions to have final concentrations of 0.19, 0.38 and 0.75 µg/mL. Linear regressions were applied to model relative chromatographic areas vs concentrations. These regressions took in consideration the presence of matrix in standard solutions and in order to highlight matrix effect they were compared to the regressions obtained with standards in methanol (0.25, 0.50 and 1.00 µg/mL).

2.8. Evaluation of the sample preparation

The choice of the extracting solvents was done after different tests and by the comparison of the peptaibol extraction levels from the fungal biomass of the cultured strain *T. longibrachiatum* (MMS 151). The solvent or solvent mixtures involved in the extraction tests were: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), ethyl acetate, *n*-butanol, acetone/CH₃COOH 1% and CH₂Cl₂/ethyl acetate (1:1, v/v). The better solvent or solvent mixture was then used for the determination of the sample recoveries and all the other experiments.

The recovery of the extraction protocol was determined for the shortest and the longest-chain peptaibols, i.e., PEP-11 and PEP-20. The fungal biomass of a *T. longibrachiatum* cultured strain (MMS 151) was separated in 3 equivalent parts (considered as triplicates) and they were spiked with both standards. The peptaibols were added in order to find a final concentration of 1.00 µg/mL in the sample, considering 100% of recovery. After the biomass extraction and the sample preparation, the concentrations of both standards in the *Trichoderma* crude extracts were determined in the triplicates using the corresponding calibration curves and the recovery values were calculated.

2.9. Application of the validated quantification methods

The quantification of the different peptaibol subgroups were realized by summing the relative areas of chromatogram peaks obtained with the characteristic ions of each subgroup, then, by determining the corresponding concentrations with the external calibration curve.

2.9.1. Peptaibol production kinetic study

The fungal strain MMS151 (*T. longibrachiatum*) was chosen to study the peptaibol production kinetic because it is a strain producing the shortest- and longest-chain peptaibols, i.e., 11- and 20-residue peptaibols. This strain were cultured in 36 Petri dishes (10-cm diameter) containing DCA medium. The fungal cultures were harvested in 3 dishes at several times of culture (2, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23 days). Then, the crude extracts and peptaibols were obtained and analyzed respectively as mentioned above. The optimal culture time for peptaibol production will be determined.

2.9.2. Peptaibol production study by *Trichoderma* sp.

Crude extracts of twelve marine-derived and one commercial *Trichoderma* strains were obtained after a culture time of 9 days.

These stains were selected to represent a wide panel of characteristic ions of the peptaibol subgroups shown in Table 2. Extraction, sample preparation and analyses were performed as explained above. The peptaibol production of these stains will be determined according to the length of chain of peptaibols by the LC-MS validated methods.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

3.1.1. Specificity

No chromatographic peaks of characteristic ions of PEP-11, PEP-14 and PEP-20 were detected at their respective retention times in methanol.

3.1.2. Linearity

The linear regressions, the slopes, the y-intercepts and the determination coefficients (R^2) for each standard (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) are shown in Fig. 1.

The R^2 values calculated for the 3 standards were higher than 0.98. They are consequently considered as acceptable since the linear regressions were built with 3 different injections of calibration levels. Moreover, variance analyses validated the linear models of the three regressions performed with PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The same results were observed for all of them: $F_{\text{reg}} < F_{\text{table}}$ with $p < 0.0001 \Rightarrow$ significant regression and $F_{\text{nl}} > F_{\text{table}}$ with $p < 0.0001 \Rightarrow$ the linear model can be applicable. The responses relative area/concentration were different according to the length of the peptaibol standards. These differences were probably due to different ionization of the standards. The ionization of the peptaibols seems to decrease with the length of their residue chain, leading to a quantification method sensitivity of 11-residue peptaibol (PEP-11) significantly higher than those of the longer peptaibols (14- and 20- residue). Then, the quantification method sensitivity is higher for 14-residue peptaibols compared to 20-residue peptaibols but the difference is not as great as compared to 11- residue peptaibols. These results show that an appropriated calibration is needed in function of the peptaibol chain length. The calibration curve of PEP-20 was chosen to quantify the 17–20-residue peptaibols. It seemed to be more adapted since all the longest peptaibols present structural similarities compared to the shortest ones. For example, shortest peptaibols (11–14-residues) contain more proline residues than longest ones (17–20-residues) leading to a structural deformation [34].

3.1.3. LOD and LOQ

The calculated LOD were respectively 0.05, 0.02 and 0.06 µg/mL for PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The LOQ values were determined as 0.16, 0.07 and 0.22 µg/mL for PEP-11, PEP-14 and PEP-20 respectively. Considering the better sensitivity of PEP-11 quantification method, the obtained LOD and LOQ values seemed high compared to the others. Nevertheless, these results could be attributed to a higher y-intercept for PEP-11 regression probably due to a higher noise of the corresponding target ion.

3.1.4. Intra- and inter-assay precisions and accuracies

Results of intra- and inter-assay precisions and accuracies are given in Table 3. Concerning intra-assay results, the maximum %CV were 6%, 8% and 12%, respectively for PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The back-calculated concentrations were within 5%, 7% and 10% of the nominal concentration for all levels of PEP-11, PEP-14 and PEP-20 respectively. About inter-assay results, the maximum %CV were 7%, 11% and 15% for PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively. The mean percentage deviation of the back calculated concentra-

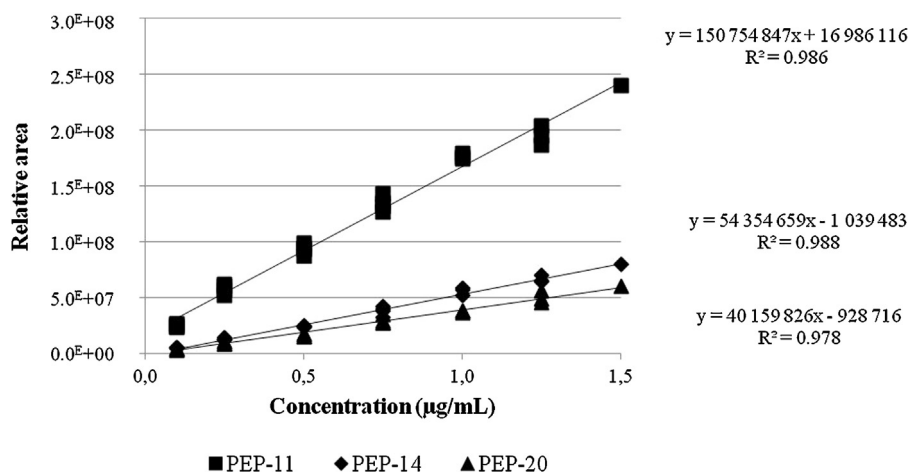


Fig. 1. Linear regressions, equations and determination coefficients of external calibration curves of PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively 11-, 14- and 20-residue peptaibols injected in triplicates.

Table 3

Results of intra- and inter-assay precisions and accuracies of the LC–MS methods develop to quantify peptaibols in *Trichoderma* crude extracts.

Analyte	Nominal concentration (µg/mL)	Intra-assay (n = 6)			Inter-assay (n = 3)		
		Mean calculated concentration ± SD (µg/mL)	Accuracy (%bias)	%CV	Mean calculated concentration ± SD (µg/mL)	Accuracy (%bias)	%CV
PEP-11	0.25				0.26 ± 0.03	8	7
	0.50	0.51 ± 0.04	5	6	0.52 ± 0.02	4	5
	0.75	0.74 ± 0.05	5	6	0.79 ± 0.04	5	5
	1.00	1.01 ± 0.06	5	6	1.05 ± 0.01	2	2
	1.25				1.21 ± 0.04	5	4
PEP-14	0.10				0.12 ± 0.00	6	9
	0.25				0.25 ± 0.01	2	7
	0.50	0.50 ± 0.03	5	7	0.48 ± 0.01	2	2
	0.75	0.74 ± 0.05	7	8	0.70 ± 0.07	11	11
	1.00	1.00 ± 0.04	4	5	1.05 ± 0.07	8	6
PEP-20	0.25				0.25 ± 0.02	8	11
	0.50	0.51 ± 0.04	8	10	0.44 ± 0.03	7	8
	0.75	0.74 ± 0.04	5	6	0.79 ± 0.10	15	12
	1.00	1.01 ± 0.12	10	12	0.97 ± 0.02	2	15
	1.25				1.27 ± 0.13	12	10

SD: standard deviation.

tions were within 8%, 11% and 15% of the nominal concentrations respectively for all levels of PEP-11, PEP-14 and PEP-20.

3.1.5. Matrix effect

The target ions of PEP-11 and PEP-20, respectively $m/z = 1197$ and 1004 , were observed in the crude extract of *T. longibrachiatum*, as illustrated in Fig. 2A,C. About the characteristic ion of the standard PEP-11, this result was expectable since the same m/z was reported for 11-residue peptaibols produced by *Trichoderma* sp. Nevertheless, since PEP-11 and the 11-residue peptaibols had not the same sequences, they had not exactly the same retention time (RT). The relative area of the chromatographic peak at $m/z = 1197$ in the crude extract diluted by a factor 2 (RT = 13.24 min, Fig. 2A) represented 25% of the relative area obtained for the two peaks at $m/z = 1197$ in spiked crude extract at 0.75 µg/mL of PEP-11 (RT = 10.91 + 13.24 min, Fig. 2D). About the characteristic ion of PEP-20, the observed ion at $m/z = 1004$ in crude extract was not due to peptaibols produced by *Trichoderma* strains. The relative area of the chromatographic peak of $m/z = 1004$ (RT = 11.26 min, Fig. 2C) was under the method LOD. This unexpected response

could be due to the use of a low resolution mass spectrometer. It do not allow the differentiation of the PEP-20 characteristic ion (monocharged sodium adduct; $m/z = 1004$) and those of 20-residue peptaibols (monocharged sodium adduct; $m/z = 1005$).

About PEP-14, Fig. 2B compared to Fig. 2E show that ion at $m/z = 1417$ was not present in the crude extract since no chromatographic peak was detected. The linear regressions obtained with spiked crude extracts compared to those obtained with standards in methanol allow concluding that no matrix effects exist since the ratios between the slopes were lower than 5% (4%, 2% and 1% for PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively). Since no matrix effect was revealed, the quantifications of strain production was performed with external calibration. Consequently, there is no peak from any standards which could lead to an error of quantification of strain production.

3.2. Evaluation of sample preparation

The calculated extraction efficiencies from the extracted peptaibol levels of *T. longibrachiatum* strain (MMS 151) showed that

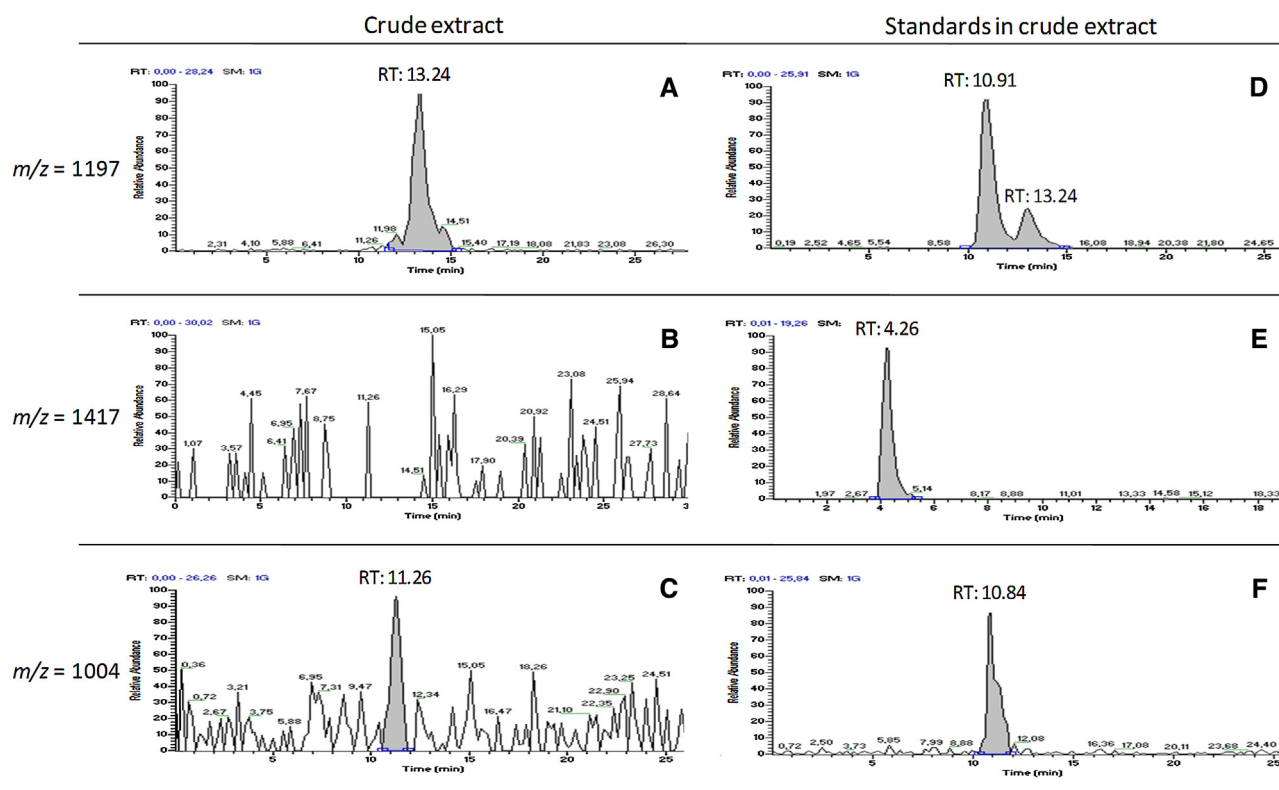


Fig. 2. Chromatograms of crude extract of *Trichoderma longibrachiatum* (MMS 151) and standards (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) in methanol (A and D: $m/z = 1197$; B and E: $m/z = 1417$; C and F: $m/z = 1004$).

the more efficient solvent mixture for peptaibol extraction was MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v). The levels were about 3 times lower for acetone/CH₃COOH 1%, CH₂Cl₂/ethyl acetate (1:1, v/v) and *n*-butanol. With ethyl acetate, the extraction level was more than 6 times lower than with the best solvent mixture. Consequently, MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v) was chosen for the determination of sample recoveries as well as for all the other strain extractions. In order to extract a larger amount of peptaibols, the extraction were performed with 2 extraction steps involving increased polarity of solvent mixtures, i.e., MeOH/CH₂Cl₂ 1:2 then 2:1 (v/v), corresponding to a final proportion of 1:1.

Recovery values of extraction and sample preparation were $21.1 \pm 5.4\%$ and $31.5 \pm 9.9\%$ for PEP-11 and PEP-20, respectively. These values are not significantly different each other (Mann-Whitney test, $p = 0.05$). Consequently, whatever the peptaibol subgroups, the extractions could not be considered as different. Even though the recoveries of both standards were not optimal, they were quite consistent and reproducible. The molecules of interest could be lost during the distilled water wash or during the filtration step which would explain the low extraction recoveries. Nevertheless, in this study, the main application of these quantification procedures was to screen strains for their high production of peptaibols to use them as biological control agents. Consequently, peptaibols produced in low concentrations were not interesting. An optimization of the extraction recoveries could be needed to response to another problematic. Other solvent mixtures could lead to a better extraction, improving recovery yields.

3.3. Applications of the validated quantification methods

3.3.1. Assignment of target ions to peptaibol subgroups

The assignment of target ions was achieved with the peptaibol clades and some sequences described in the literature. Nevertheless, some assignments need to be clarified.

Usually, 14-residue peptaibols are represented by characteristic ions with m/z lower than 1500 [35,36]. In the present study, m/z values of 1506, 1520 and 1534 were assigned to putative 14-residue peptaibols (Table 2) because they were observed in a *Trichoderma harzianum* strain, species usually producing 14- and 18-peptaibols [35]. This assignment will have to be confirmed by a sequencing of these observed ions.

In addition, there is an overlapping zone between the 19- and 20-residue peptaibol characteristic ions. But a *Trichoderma* strain seems not produce simultaneously 19- and 20-residue peptaibols [35,37]. Moreover, the peptaibol subgroup production by *Trichoderma* species can be reported in literature and/or determined by sequencing of the characteristic ions in mass spectrometry. Consequently, the individual quantification of 19- and 20-residue peptaibols is possible by low-resolution mass spectrometry.

3.3.2. Peptaibol production kinetic study

The validated methods allowed the quantitative determination of peptaibol subgroups produced by *Trichoderma* sp. Consequently, they were quantified in *T. longibrachiatum* strain (MMS151) crude extracts during 23 days. MMS151 strain produces 11- and 20-residue peptaibols [38–40]. Using the quantification methods, 20-residue peptaibols appeared as singly charged $[M+Na]^+$ and doubly charged $[M+2Na]^{2+}$ whereas 11-residue peptaibols appeared exclusively as singly charged sodium adducts as shown in Fig. 3.

The 11- and 20-residue peptaibols were quantified using the method achieved respectively with standards PEP-11 and PEP-20. Fig. 4 shows the mean of 11- and 20-residue peptaibol proportions in the fungal wet biomass of MMS 151 during the 23 days of the kinetic study. Fig. 4 shows that the trends of both peptaibol kinetic productions (11- and 20-residues) were similar. Before the 3rd day, the peptaibol productions were under the limit of quantification of the methods. Then, the productions began from the 3rd day to

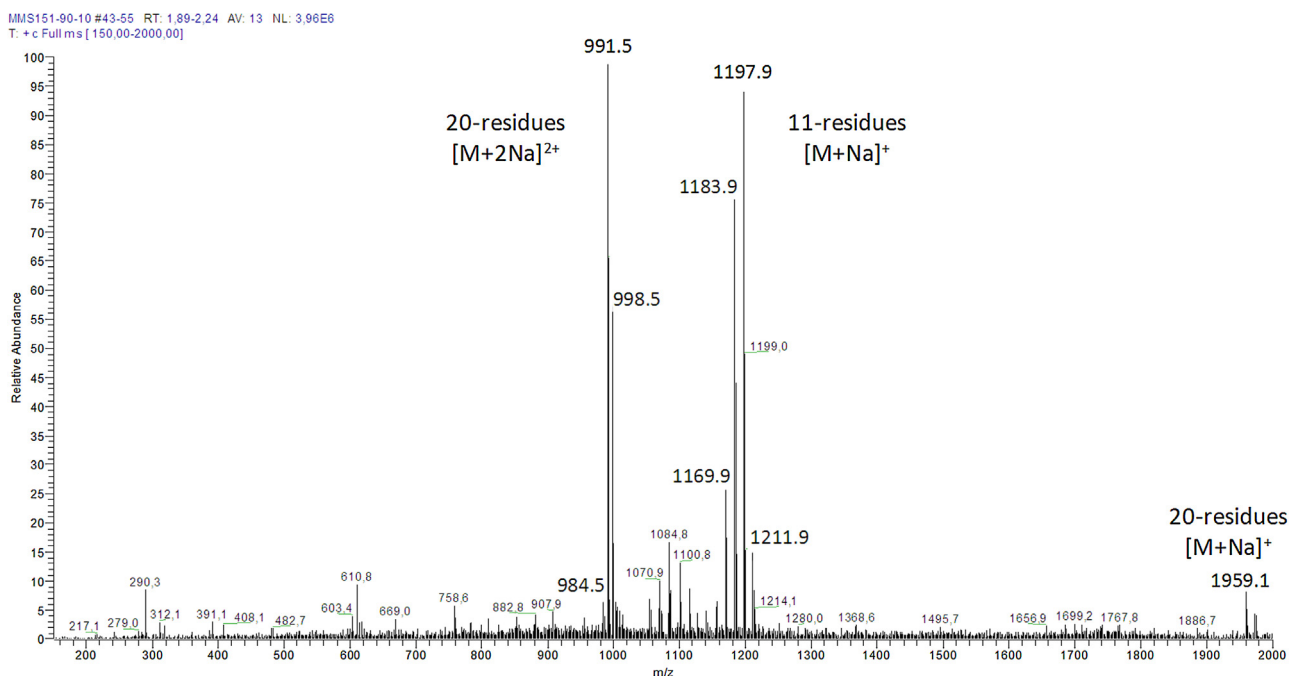


Fig. 3. Mass spectrum of crude extract of *Trichoderma longibrachiatum* strain (MMS151).

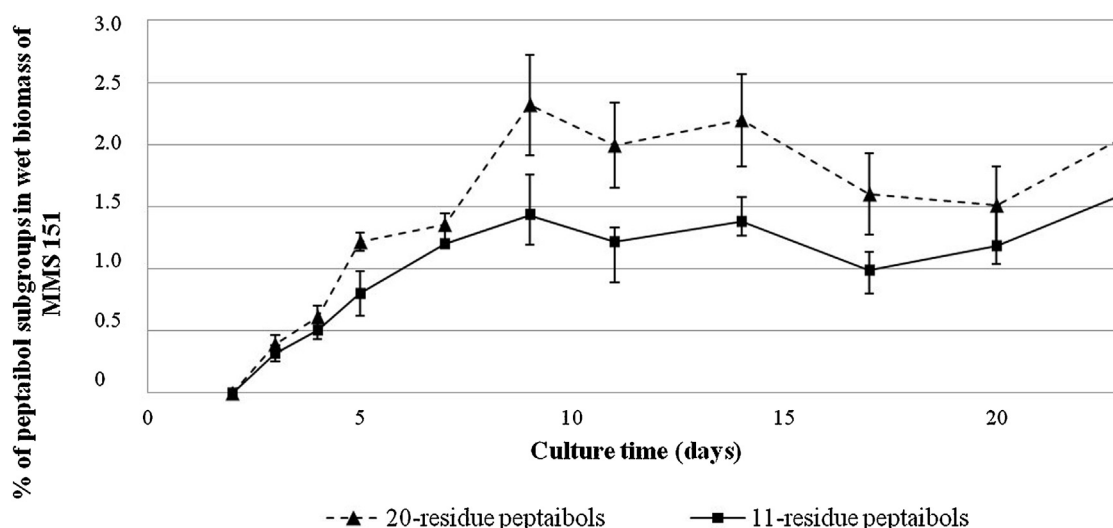


Fig. 4. Mean and standard deviation ($n=3$) of 11- and 20-residue peptaibol subgroup proportions, normalized to the wet biomass, during the time.

reach the maximum levels at the 9th day which corresponded to the beginning of a plateau until 23 days. At the 9th day of culture, 11- and 20-residue peptaibols represented $1.4\% \pm 0.2$ and $2.3\% \pm 0.4$ of the MMS 151 biomass, respectively.

The study of Mikkola et al. [26] also quantified peptaibols in a *T. longibrachiatum* crude extract by HPLC/ESI-IT-MS. They found two peptaibol subgroups, i.e., 11- and 20-residues, representing 0.02–0.16% and 0.5–2.6% of the wet biomass at 15 days of culture, respectively. The difference of strains and of broths used for cultures could explain the difference of results with the present study. Mikkola et al., used malt extract agar (MEA) as culture broth whereas MMS 151 was cultured on DCA medium. It is commonly accepted that the culture broth change can lead to a variation of the metabolite productions [41]. Moreover, they quantified some peptaibols and not the whole subgroups, with alamethicin as standard, whatever the peptaibol length.

A qualitative kinetic study of trichobrachin (11-residue peptaibol) production by *Trichoderma parceramosum*, cultivated on MEA medium, was previously achieved by thin layer chromatography (TLC) [42]. Trichobrachins-TBIII production presented a similar trend of 11- and 20-residue peptaibol productions with detection from the 2nd culture day and a maximum at the 5th culture day.

According to the results shown in Fig. 4, the optimal peptaibol production was obtained at the 9th day for *T. longibrachiatum* MMS151. From these results and in order to evaluate the peptaibol productions of the 12 other *Trichoderma* strains (see above), they were cultured during 9 days in DCA medium, even if their optimal peptaibol production time could be different.

3.3.3. Study of peptaibol production in *Trichoderma* crude extracts

Consequently, the peptaibol subgroups in crude extracts of different *Trichoderma* strains were quantified at the 9th day and the

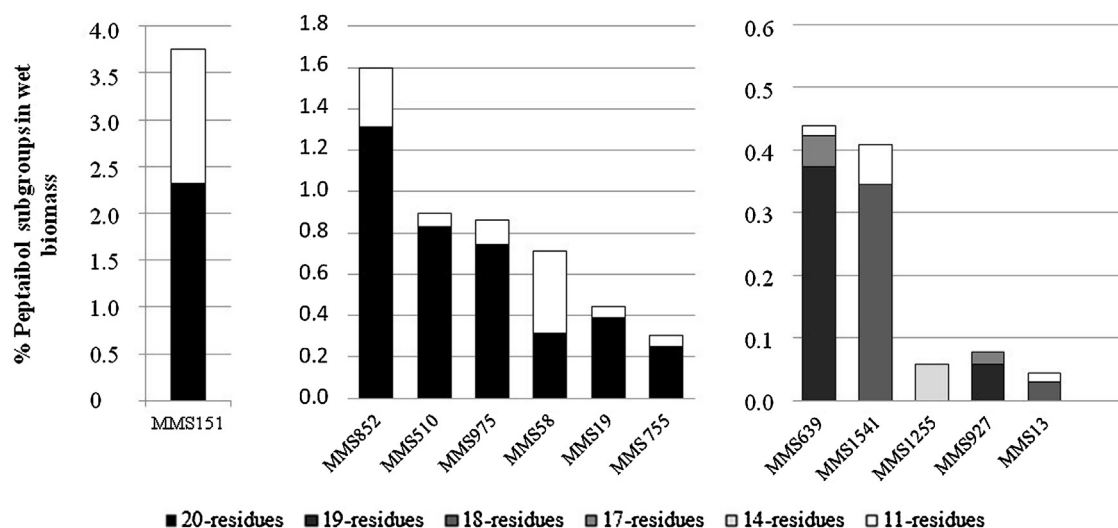


Fig. 5. Proportions normalized to the wet biomass of peptaibol subgroups in 13 *Trichoderma* strains.

results are shown in Fig. 5. The peptaibol subgroup productions fluctuated strain to strain. Usually, when 18-residue peptaibols were produced by some strains, 14-residue peptaibols were also produced. These results were also observed in a previous study [35]. The concerned strains were *T. harzianum* (MMS 13, MMS 1255 and T 22) and *Trichoderma pleuroticola* (MMS 1541), which belongs to the same phylogenetic clade [35,43]. Nevertheless, the productions of 14-residue and 18-residue peptaibols were sometimes too low to reach the LOD of the quantification method, respectively for MMS 13, MMS 1541 and MMS 1255. The peptaibols detected in T22 (*T. harzianum*) crude extracts were under the LOQ of the quantification method (not represented).

The same result was observed for 17-residue peptaibols which were produced together with 19-residue peptaibols by two *T. atroviride* (MMS 639 and MMS 927). An hypothesis was given by Carroux et al. [32], i.e., the 17-residue peptaibols could be truncated 19-residue peptaibols due to an error during the biosynthesis.

The *T. longibrachiatum* strains (MMS 151 and MMS 58) produced high proportions of 20-residue peptaibols. It was also observed for *Trichoderma reesei* (MMS 510), *Trichoderma ghanense* (MMS 975), *Trichoderma citrinoviride* (MMS 19) and *Trichoderma capillare* (MMS 755). From a phylogenetic point of view, these strains are close, i.e., in a same clade [35,43,44].

Concerning the biocontrol purpose, the most interesting strains were those producing long-chain peptaibols. The longest peptaibols are indeed able to form voltage dependent ion channels in the lipid membranes which can lead to the phytopathogen cell death [45]. Moreover, depending on the target pathogen, the peptaibol subgroups could have not the same efficiency. Consequently, the final aim of the quantification would be the selection of the *Trichoderma* strains according to their production of long-chain peptaibols (up to 17-residues). Three strains seemed interesting, i.e., MMS 151, MMS 639 and MMS 1541 for the respective production of 20-, 19- and 18-residue peptaibols. This selection of strains was only based on the peptaibol productions and other information has to be taken into account for their use of as biocontrol agents. For example, some *Trichoderma* species, such as *T. longibrachiatum*, are able to cause opportunistic infections in immunocompromised humans [46]. *T. harzianum* could produce mycotoxins [28]. Nevertheless, *Trichoderma* infection in human or animal are quite rare [2] and the use of purified peptaibol mixtures as biocontrol agents could be considered in order to avoid the potential mycotoxin presence.

4. Conclusion

LC-ESI/IT/MS methods were developed and validated for peptaibol subgroup quantification. The analytical responses of the peptaibols were depending on their lengths. The quantification of all the peptaibols by only one standard, classically alamethicin (20-residue peptaibols), may lead to errors, particularly on the shortest-chain peptaibol quantification.

These methods were successfully applied to study a peptaibol production kinetic and to quantify peptaibols in crude extracts produced by *Trichoderma* species. This study permitted to determine the optimal culture time of a *Trichoderma* strain (*T. longibrachiatum*, MMS151) at the 9th day. The different peptaibol subgroup productions were consequently quantified after 9 days of culture in crude extracts to select new potential biocontrol agents. A screening was performed to select the most peptaibol producing strains. However, metabolomics and dereplication studies will be needed to make sure that these marine-derived *Trichoderma* strains do not produce mycotoxins before their potential use as biocontrol agent. Nevertheless, to overcome this problem, the direct use of purified peptaibol subgroups as biocontrol agent could be considered.

Acknowledgements

We are grateful to the platform ThalassOMICS of Biogenouest, to M. Thibault Robiou du Pont for his technical support, to the NABUCO program of the Ecophyto plan of the French Ministry for Agriculture and Food for funding and to the French Ministry for Education and Research for a PhD grant.

References

- [1] A. Schuster, M. Schmoll, Biology and biotechnology of *Trichoderma*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (July (3)) (2010) 787–799, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>, Epub 2010 May 12.2010.
- [2] T. Degenkolb, K. Fog Nielsen, R. Dieckmann, F. Branco-Rocha, P. Chaverri, G.J. Samuels, U. Thrane, H. von Dohren, A. Vilcinskis, H. Bruckner, Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex, Chem. Biodivers. 12 (2015) 662–684.
- [3] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Gräfe, The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions, J. Pept. Sci. 9 (2003) 666–678.

- [4] J.K. Chugh, B.A. Walalce, Peptaibols models for ion channels, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 565–570.
- [5] T. Degenkolb, J. Kirschbaum, H. Brückner, New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1052–1067.
- [6] T. Degenkolb, W. Gams, H. Brückner, Natural cyclopeptaibiotics and related cyclic tetrapeptides: structural diversity and future prospects, *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 693–706.
- [7] H. Duclouhier, Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1023–1026.
- [8] M. Shi, H.N. Wang, S.T. Xie, Y. Luo, C.Y. Sun, X.L. Chen, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Cancer* 9 (2010) 26.
- [9] S.U. Oh, B.S. Yun, S.J. Lee, J.H. Kim, I.D. Yoo, Atroviridins A–C and neoatroviridins A–D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot.* 55 (2002) 557–564.
- [10] M.Y. Summers, F. Kong, X. Feng, M.M. Siegel, J.E. Janso, E.I. Graziani, G.T. Carter, Septocylindrin A and B: peptaibols produced by the terrestrial fungus *Septocylindrium* sp. LL-Z1518, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 391–396.
- [11] H.N. Su, Z.H. Chen, X.Y. Song, X.L. Chen, M. Shi, B.C. Zhou, X. Zhao, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptide trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*, *PLoS One* 7 (2012) 25.
- [12] P. Pruksakorn, M. Arai, N. Kotoku, C. Vilchère, A.D. Baughn, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr, M. Kobayashi, Trichodermins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3658–3663.
- [13] P. Pruksakorn, M. Arai, L. Liu, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi, Action-mechanism of trichodermin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1287–1290.
- [14] M. Shi, L. Chen, X.W. Wang, T. Zhang, P.B. Zhao, X.Y. Song, C.Y. Sun, X.L. Chen, B.C. Zhou, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens, *Microbiology* 158 (2012) 166–175.
- [15] A. Viterbo, A. Wiest, Y. Brotman, I. Chet, C. Kenerley, The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses, *Mol. Plant. Pathol.* 8 (2007) 737–746.
- [16] A. Wiest, D. Grzegorski, B.W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D.J. Ebbola, B. Bodo, C. Kenerley, Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20862–20868.
- [17] B.S. Yun, I.D. Yoo, Y.H. Kim, Y.S. Kim, S.J. Lee, K.S. Kim, W.H. Yeo, Peptaivirins two new antiviral peptaibols against TMV infection, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 1429–1431.
- [18] Y.H. Kim, W.H. Yeo, Y.S. Kim, S.Y. Chae, K.S. Kim, Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (2000) 522–528.
- [19] Y. Luo, D.D. Zhang, X.W. Dong, P.B. Zhao, L.L. Chen, X.Y. Song, X.J. Wang, X.L. Chen, M. Shi, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus, *FEMS Microbiol. Lett.* 313 (2010) 120–126.
- [20] M. El Hajji, S. Rebuffat, T. Le Doan, G. Klein, M. Satre, B. Bodo, Interaction of trichorizianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*, *BBA-Biomembranes* 978 (1989) 97–104.
- [21] G. Nagaraj, M.V. Uma, M.S. Shivayogi, H. Balaram, Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 145–149.
- [22] T. Degenkolb, T. Gräfenham, A. Berg, H.I. Nirenberg, W. Gams, H. Brückner, Peptaibiotics, Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species, *Chem. Biodivers.* 3 (2006) 593–610.
- [23] M.S.P. Sansom, Structure and function of channel-forming peptaibols, *Q. Rev. Biophys.* 26 (1993) 365–421.
- [24] M.S. Sansom, The biophysics of peptide models of ion channels, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 55 (1991) 139–235.
- [25] N. Stoppacher, N.K. Neumann, L. Burgstaller, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, The comprehensive peptaibiotics database, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 734–743.
- [26] R. Mikkola, M.A. Andersson, L. Kredics, P.A. Grigoriev, N. Sundell, M.S. Salkinoja-Salonen, 20-residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺ permeable channels and adverse action towards mammalian cells, *FEBS J.* 279 (2012) 4172–4190.
- [27] L. Poirier, J.C. Amiard, F. Mondegue, F. Quiniou, N. Ruiz, Y.F. Pouchus, M. Montagu, Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 106–113.
- [28] T. Degenkolb, R. Dieckmann, K.F. Nielsen, T. Gräfenham, C. Theis, D. Zafari, P. Chaverri, A. Ismaiel, H. Brückner, H. von Döhren, U. Thrane, O. Petrini, G.J. Samuels, The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins, *Mycol. Prog.* 7 (2008) 177–219.
- [29] K. Ben Haj Salah, N. Inguibert, Efficient microwave-assisted one shot synthesis of peptaibols using inexpensive coupling reagents, *Org. Lett.* 16 (2014) 1783–1785.
- [30] D. Becker, M. Kiess, H. Brückner, Structure of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto, *Liebigs Ann. Rec.* (1997) 767–772.
- [31] A. Berg, M. Ritzau, W. Ihn, B. Schlegel, W.F. Fleck, S. Heinze, U. Gräfe, Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059, *J. Antibiot.* 49 (1996) 817–820.
- [32] A. Carroux, A.I. Van Bohemen, C. Roullier, T. Robiou du Pont, M. Vansteelandt, A. Bondon, A. Zalouk-Vernoux, Y.F. Pouchus, N. Ruiz, Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 772–786.
- [33] F.a.D.A. USDepartment of Health and Human Services, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Centre for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107>, 2001.
- [34] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, M.F. Roquebert, The peptaibols antibiotics from *Trichoderma* soil fungi: structural diversity and membrane properties, *Recent Res. Dev. Org. Bioorg. Chem.* 3 (1999) 65–91.
- [35] T. Neuhoef, R. Dieckmann, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, H. von Döhren, Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiology* 153 (2007) 3417–3437.
- [36] T. Degenkolb, R. Karimi Aghcheh, R. Dieckmann, T. Neuhoef, S.E. Baker, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, H. Brückner, H. von Döhren, The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*, *Chem. Biodivers.* 9 (2012) 499–535.
- [37] N.K. Neumann, N. Stoppacher, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, The peptaibiotics database—a comprehensive online resource, *Chem. Biodivers.* 12 (2015) 743–751.
- [38] N. Ruiz, G. Wielgosz-Collin, L. Poirier, O. Grovel, K.E. Petit, M. Mohamed-Benkada, T. Robiou du Pont, J. Bissett, P. Vêrité, G. Barnathan, Y.F. Pouchus, New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*, *Peptides* 28 (2007) 1351–1358.
- [39] L. Poirier, F. Quiniou, N. Ruiz, M. Montagu, J.C. Amiard, Y.F. Pouchus, Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos, *Aquat. Toxicol.* 83 (2007) 254–262.
- [40] N. Ruiz, K.E. Petit, M. Vansteelandt, I. Kerzaon, J. Baudet, Z. Amzil, J.F. Biard, O. Grovel, Y.F. Pouchus, Enhancement of domoic acid neurotoxicity on diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites, *Toxicon* 55 (2010) 805–810.
- [41] H.B. Bode, B. Bethe, R. Hofs, A. Zeeck, Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity, *Chembiochem* 3 (2002) 619–627.
- [42] C. Krause, J. Kirschbaum, H. Brückner, Peptaibiotics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of Trichobrachins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* Bissett (*T. longibrachiatum* Rifai), *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1083–1102.
- [43] W.M. Jaklitsch, European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores, *Fungal Divers.* 48 (2011) 1–250.
- [44] G.J. Samuels, A. Ismaiel, T.B. Mulaw, G. Szakacs, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, W.M. Jaklitsch, The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species, *Fungal Divers.* 55 (2012) 77–108.
- [45] L. Béven, O. Helluin, G. Molle, H. Duclouhier, H. Wróblewski, Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1421 (1999) 53–63.
- [46] I.S. Druzhinina, V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev, C.P. Kubicek, *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 749–759.



Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life?

Nam Ngoc Phuong^{a,b}, Laurence Poirier^a, Quoc Tuan Pham^b, Fabienne Lagarde^c,
Aurore Zalouk-Vergnoux^{a,*}

^a Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes F-44000, France

^b PhuTho college of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong Boulevard, Viettri City, PhuTho Province 290000, Viet Nam

^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, Le Mans F-72000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Microplastics

Mussel

Oyster

Influencing factor

Qualitative and quantitative analysis

ABSTRACT

Monitoring the presence of microplastics (MP) in marine organisms is currently of high importance. This paper presents the qualitative and quantitative MP contamination of two bivalves from the French Atlantic coasts: the blue mussel (*Mytilus edulis*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Three factors potentially influencing the contamination were investigated by collecting at different sampling sites and different seasons, organisms both wild and cultivated. Inter- and intra-species comparisons were also achieved. MP quantity in organisms was evaluated at 0.61 ± 0.56 and 2.1 ± 1.7 MP per individual respectively for mussels and oysters. Eight different polymers were identified. Most of the MPs were fragments; about a half of MPs were grey colored and a half with a size ranging from 50 to 100 μm for both studied species. Some inter-specific differences were found but no evidence for sampling site, season or mode of life effect was highlighted.

1. Introduction

Plastics have changed our life since their appearance in the middle of the last century (Thompson et al., 2009). They are massively used as they replaced traditional materials due to their multiple advantages. Actually, their worldwide production is increasing, reaching > 300 million tons last years (PlasticsEurope, 2015). In contrast, many damages by plastic wastes to ecosystems were observed and reported (Cole et al., 2011; Gall and Thompson, 2015) due to lacks in plastic waste management faced to the increase of plastic uses. A recent work of Jambeck et al. (2015) estimated that approximately 4.8 to 12.7 million tons of plastic wastes entered the ocean only in 2010.

Besides, plastic wastes are known as the main source of microplastics (MPs) which were defined as plastics with a size inferior to 5 mm by Arthur et al. (2009). The fragmentation of plastic wastes occurring in the environment and leading to MPs is due to mechanical, chemical and biological factors (Andrady, 2011; Costa et al., 2010; Zettler et al., 2013) and corresponds to the secondary source of contamination. The primary contamination of MPs is characterized by the microspheres used in the industry, in the personal care products for example. Because of their small size and their properties, MPs can be accumulated in the environment leading to a potential MP exposure of biota undergoing bioaccumulation and biological effects (Barnes et al.,

2009; Wright et al., 2013). The occurrence of MPs was reported in continental environments: air (Gasperi et al., 2015), freshwater (Dris et al., 2015b; Free et al., 2014; Jambeck et al., 2015), wastes and treated waters (Dris et al., 2015a), lake sediments (Fischer et al., 2016) and soil organisms (Huerta Lwanga et al., 2016; Rillig, 2012). Numerous studies focused also on marine environments, studying seawater (Cózar et al., 2015; Desforges et al., 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015); sand and sediment (Blaskovic et al., 2017; Graca et al., 2017; Woodall et al., 2014) and many marine animals (Besseling et al., 2015; Desforges et al., 2015; Karami et al., 2017). In marine ecosystems, many species of invertebrates are known to accumulate contaminants from seawater and marine sediments, representing valuable biological indicators of environmental pollution (Kaiser, 2001). Among these species, benthic suspension-feeding bivalves, such as mussels or oysters, have been widely used in biomonitoring surveys in coastal waters (e.g. the Mussel Watch program; Farrington et al., 1995; RNO, 2006), on account of their abundance and broad distribution, their suspended particle filter-feeding mode, their sedentary living and their importance for human food web. As for chemical hazards, these species may be good indicators of MP contamination in the water column (Avio et al., 2017). Published studies presenting data on MP contamination in marine bivalves are scarce at this moment even if many of them are currently performed. Comparisons are furthermore debatable because

* Corresponding author.

E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

of a lack of standardized protocols (Phuong et al., 2016).

In this context, the present study aimed to evaluate the MP contents of two filter-feeder bivalve species, the blue mussel, *Mytilus edulis* and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, collected on the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France) according to a validated protocol (Phuong et al., 2016). Mussels and oysters have a considerable socio-economic weight in this regional area where 16 thousand tons are annually produced for national consumption. For both species, several sampling sites, seasons and modes of life (cultivated and wild) were investigated in order to determine the factors influencing the contamination and to run an inter-species comparison. The seasonality was evaluated through two sampling campaigns that were performed in autumn and spring, selected because these periods arise from times of high exposure of organisms. The beginning of autumn succeeds to summer which is a period of strong anthropic pressure due to tourism activities on the coast and it is after a warm period leading to higher rate of filtration of suspensivorous bivalves. Moreover, this time is included in the main commercialization periods of mussels (summer and autumn) and oysters (autumn and winter). The beginning of spring arises from the winter period marked by stormy climatic conditions which remobilize the contaminants stored in the sediments, increasing the risk of organism exposure.

Furthermore, the relation between MP contamination and the living environment of organisms was suggested by previous studies (Mathalon and Hill, 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Vandermeersch et al., 2015; Li et al., 2016). For example, Li et al. (2016) found significant differences between mussels sampling along about 20,000 km coastline showing that sampling location could be one important factor influencing MP content in marine ecosystems. The sampling sites chosen in this study are separated of 140 km at the maximum. They were selected because of the intensive and important shellfish aquaculture for regional and national socio-economy and because they are under different oceanic and terrigenous influences. Moreover, wild mussels were shown to be more contaminated than farmed ones in this latter study, while the opposite was found by Mathalon and Hill (2014). As numerous tools made of plastic are used in mussel and oyster farms for spat collection or on-growing stages, wild and cultivated organisms from different major farming areas along the Atlantic coast were analyzed in the present work to investigate the influence of farming practices on MP contents, and assess the spatial variations of MP contamination. Overall, it provides first data on the MP contamination level of the French Atlantic coast for these two chosen bivalve species, contributing to the global MP contamination assessment.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

KOH pellets were purchased from CARLOERBA reagents (France); KI pellets were from VWR (France) and the membrane filters of cellulose nitrate with pores of 12 µm and 25 mm of diameter were provided by Whatman (Germany).

2.2. Sample collection strategy

Fig. 1 shows the sampling locations of adult mussels (*M. edulis*) and oysters (*C. gigas*) on French Atlantic coasts (Pays de la Loire region, France). Oysters were sampled in the three points located on the map: Pen-Bé (N 47°25'33" W 2°27'46"), Coupelasse (N 47°01'19" W 2°01'59") and Aiguillon Bay (N 46°16'26" W 1°14'14") while mussels were only sampled in Pen-Bé and Aiguillon Bay because of their absence in the third site. For each sampling site, wild and cultivated organisms were randomly collected at two different seasons: October 2015 (beginning of autumn) and March 2016 (beginning of spring).

The sampling site Pen-Bé is located in the Pen-Bé bay. The watershed of the bay is mainly represented by agriculture activities (60%)

and urbanization (15%) (IFREMER, 2006). The urbanization is quite limited since the towns present in the watershed do not have > 2000 inhabitants. Activities of salt production are also present in the watershed (580 ha) as well as the aquaculture of mussels and oysters (280 ha). The supply of freshwater of the bay is limited. The impacts of the Loire estuary are negligible whereas those of the estuary of the Vilaine can be considered depending on weather conditions. In the bay, it was measured that about 41 to 92% of the water is renewed after 5 tidal cycles. The samples were collected at about 300 m of the coastline.

Coupelasse is located in the bay of Bourgneuf (340 km²). The watershed is mainly represented by protected zones (habitats and birds), in particular in the south where the marsh Breton is recognized for its biodiversity as 3rd national wetland (IFREMER, 1997). The main supply of freshwater is done by Millac, a small river draining a watershed composed of hedgerows, grasslands and 2 towns in its downstream part (Les Moutiers en Retz and Bourneuf en Retz: 1500 inhabitants and 3500 inhabitants respectively) (Schéma d'aménagement et de gestion des eaux du marais breton et du bassin versant de la baie de Bourgneuf, 2014). It is the main shellfish farming area in the Pays de la Loire region with high oyster farming activity (90%) and little mussel farming explaining why no mussels were sampled for this study. This area is separated from the ocean by the island of Noirmoutier which shelters it from the swell. It communicates with the ocean to the north through an opening of 12 km. The oceanic waters more salted than the waters of Bourgneuf lead to a difficult mixing of them. It was estimated that it takes about 2 months for the waters of the Bay of Bourgneuf to be renewed by ocean waters. The bay is to the south of the Loire estuary but its plume rarely penetrates the bay only by northerly wind or in low water period. The samples were collected at about 1 km of the coastline.

The samples taken in Aiguillon bay were collected just outside the bay to the north, remaining in the Pays de la Loire region. This site is exposed offshore and is under oceanic and terrigenous influences (IFREMER, 1996). The terrigenous influence is limited and comes from the bay where the residence times of the waters appear to be quite long and the exchanges relatively limited with the outside. Freshwater supply of the bay is due to the rivers Sèvre Niortaise and the Lay and less frequently to the Canal du Curé. All these rivers drain the watershed of the Poitevin marsh which is a protected zone. Along the coast, an extensive mussel farming activity occurs accounting for 15% of the national production. The samples were collected at about 300 m of the coastline.

Five samples, i.e. 5 oysters and 5 pools of 3 mussels, were analyzed per sampling location, per season and per mode of life, leading to a total of 180 marine bivalves: 60 oysters and 120 mussels.

2.3. Biometric parameters and sample preparation

After the collection, organisms were placed in sealed freezer plastic bags made of PE and conducted to the laboratory in a refrigerated enclosure. Organisms were then kept in bags at − 20 °C until analysis. All of laboratory experiments were carefully performed with the aim of preventing MP contamination. Concerning sample preparation, the bivalves were taken out of the freezer for thawing during 1 h. Then, each oyster and mussel shell was individually measured and the individual total wet weight without internal water and soft tissue wet weight were determined after the elimination of the byssus for the mussels. Organisms sized from 3.5 to 5.8 cm and from 7.3 and 13.7 cm for mussels and oysters respectively. The condition index (CI) was calculated according to the recommendation of the French Association for Standardization (AFNOR, 1985) using the formula: $CI = (\text{soft tissue wet weight} / \text{total wet weight without internal water}) \times 100$. CI ranged from 22.3 to 53.5 for mussels and from 17 to 46.8 for oysters.

MP analyses were performed on individual oysters and on a pool of 3 mussels following the protocol elaborated by Phuong et al. (2017). In brief, the sample (one oyster or a pool of 3 mussels) was placed into a

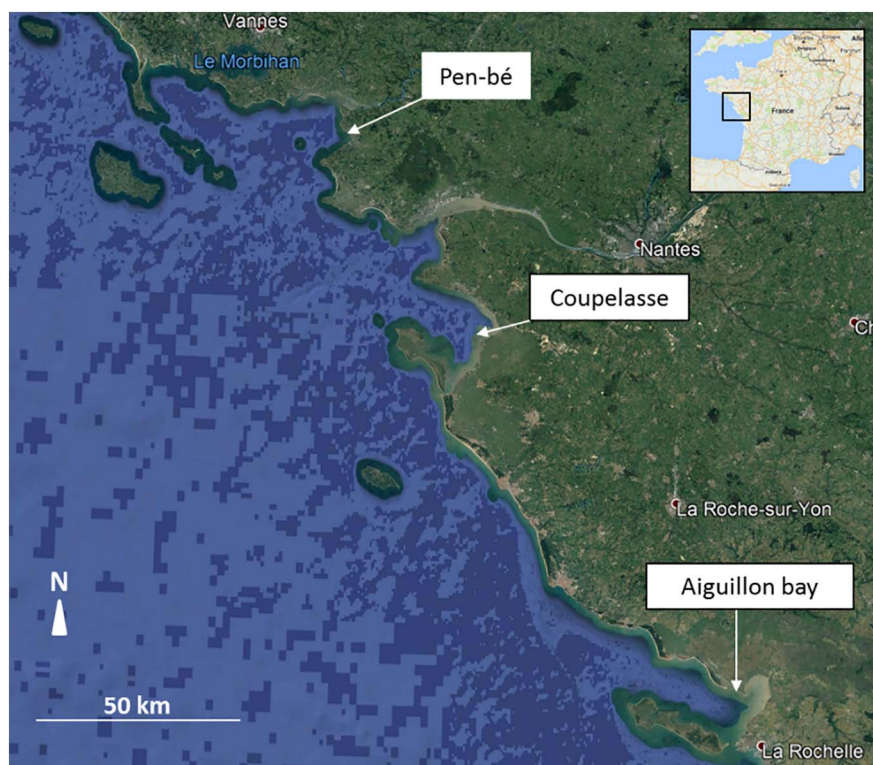


Fig. 1. Sampling locations in Pays de la Loire, France: Pen-Bé, Coupelasse, Aiguillon Bay.

150 mL conical flask. Then 50 mL of KOH 10% (m/v) were added. The mix was heated at 60 °C and at the same time, agitated during 24 h. After the digestion, the obtained solution went through a density separation step after the transfer to a 125 mL separating funnel. After 4 h, 10 mL of the bottom solution was transferred into a second separating funnel, whereas the top of the solution was put into a 100 mL conical flask. In order to separate dense MPs from mineral particles, 20 mL of a KI solution (50%, m/v) was added into the second separating funnel. After a vigorous hand shaking, this solution was left for 4 h at room temperature. After this second decantation time, the top of the solution was then added into the conical flask with the first one. The mix of solutions was then filtered on a cellulose nitrate filter with a porosity of 12 µm. Filter was dried at room temperature in a glass Petri dish which was closed until analysis.

2.4. μ FT-IR analysis

The identification of MP types on the filters was performed by using Fourier transform infrared microscopy system (μ FT-IR; Spotlight 200i FT-IR microscopy system, PerkinElmer) in reflection mode. Each spectrum was recorded after 8 accumulations ranging from 600 to 4000 cm^{-1} and the whole surface filter was inspected, each detected particles being individually analyzed. Each obtained spectrum was then compared to the polymer database (PerkinElmer Polymer database) and the type of plastic was determined when the research score was higher than 60%. Each identified plastic particle was analyzed in order to categorize MPs according to the size: < 50 µm; from 50 to 100 µm and > 100 µm. Their color and their form were recorded for their classification according to Galgani et al. (2013).

2.5. Quality control

The main concern in terms of quality control for the analysis of MP is the cross-contamination. The first point was to lead strategies to prevent it. All equipments used in the laboratory were previously rinsed with MilliQ water and dried at room temperature avoiding contact with

the ambient air. Once dried, they were immediately kept under aluminum foil. During the analysis procedure, the contact of the digestion solution with the ambient air was limited by the use of aluminum foils. Once the filtration performed, the filters were kept in Petri dishes made of glass until the μ FT-IR analysis. During the experiments, laboratory coats made of cotton and gloves were worn all the time. Because of a remaining risk of cross-contamination of the samples, different blanks were performed. The first ones were realized following the procedure of sample preparation and μ FT-IR analysis without bivalves on 6 replicates. Then, two other types of blanks were performed to assess the potential cross-contamination due to the storage of bivalves in the plastic bags. Three plastic bags were kept with MilliQ water during 24 h and three other bags were filled of MilliQ water and frozen at – 20 °C during 24 h. Water volumes were then filtered and the obtained filters analyzed by μ FT-IR.

The other concern of the quality control is the validation of the analytical procedure which was previously performed by spiking with 20 particles of PP, PE and PVC with and without bivalves ($N = 3$ for each condition) as it was explained in a study carried on the laboratory (Phuong et al., 2017).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using XLSTAT software. The conditions for applying parametric tests, i.e. homogeneity of variance and normality, were verified using Fisher and Shapiro-Wilk tests respectively. As result of these tests, non-parametric tests (Kruskal-Wallis ANOVA (KW)) were used in order to highlight significant differences of MP contamination in bivalves collected at different locations, seasons and with different modes of life. Differences between groups were considered as significant when $p < 0.05$. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of p-value (MCP) when it was significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Quality control and MP identification

The whole analytical procedure was performed without any sample ($N = 6$) in parallel with bivalve samples to evaluate cross-contamination due to airborne, vessels and reagents. An average of $1.2 (\pm 0.8)$ particle per filter ($N = 6$) was observed by microscopy. Other types of blanks corresponding to plastic bags rinsed with MilliQ water during 24 h ($N = 3$) and placed in freezer with MilliQ water during 24 h ($N = 3$) respectively displayed $0.7 (\pm 0.6)$ and $1.3 (\pm 1.2)$ particles with the microscopic observation. The identification by μ FT-IR of all the particles found on filters corresponding to the different types of blanks concluded to no particles made of plastic.

The results of the validation of the analysis procedure performed with and without bivalves by spiking 20 particles of PP, PE and PVC were published in a previous work (Phuong et al., 2017). The conclusion was that recoveries reached about 100%, 70% and 90% for PE, PP and PVC particles leading to the procedure validation.

In bivalves, a total of 199 particles were identified as plastics by μ FT-IR among 3285 measured ones on all particles observed by microscopy. The ratio of identified MPs/measured particles reached about 6%.

3.2. MPs in mussels

3.2.1. Quantitative analysis

The whole abundance of MPs found in mussels was about 0.23 ± 0.20 MP per gram of wet weight soft tissues and about 0.60 ± 0.56 MP per individual ($N = 120$). Quantitative results of each sampling location, season and mode of life are presented in Fig. 2.

The statistical tests applied to the obtained data showed no significant differences between the abundance of MPs related to the three studied influencing factors: sampling location, season and mode of life, whatever the way of result expression (MP/g or MP/mussel). Even if no significant difference between MP contaminations was highlighted concerning the mussel mode of life, a higher detection frequency was noticed in cultivated mussels compared to wild ones. Indeed, 90% of pools of cultivated mussels presented MP particles while just 65% for pools of wild mussels.

3.2.2. Qualitative analysis

The 73 MPs identified in the whole studied mussels were distributed according to their plastic type, their color and their size for a qualitative

study (Fig. 3).

Among the MPs found in mussels, seven different natures of plastics were determined with μ FT-IR spectroscopy. The majority of identified polymers were PP and PE with respective proportion of 47 and 38% (Fig. 3I). The other plastic types reached 15% and were essentially represented by PE-PP copolymers (5.4%), polystyrene (4.1%), polymethyl methacrylate (PMMA; 2.7%), polyester (1.4%) and acrylonitrile butadiene styrene (ABS; 1.4%).

Galgani et al. (2013) proposed categorizes for shape and color of MPs. In the present study, the majority MPs was fragments reaching 82% and the remaining MPs were filaments. Several other filaments were also observed but could not be identified as polymeric fibers with μ FT-IR analysis. Regarding the color, most of MPs found in the mussels were grey-colored, counting for 51% of MPs (Fig. 3II). Then black, red, green and white MPs were observed reaching 23, 11, 8 and 7% respectively.

Concerning the size of MPs found in the mussels as shown in Fig. 3, the highest proportion up to 52% corresponded to MPs ranging from 50 to 100 μ m (Fig. 3III). Then, MPs from 20 to 50 μ m reached 37% and finally 11% of MPs were > 100 μ m. The largest particle found in mussels sized 400 μ m (a fragment of PP).

Fig. 4 is helpful in order to study the influence of the sampling site, the season and the mode of life of mussels. In Fig. 4I, the type of plastic seemed to be influenced by the mode of life of mussels in Pen-Bé. The wild mussels displayed only MPs made of PP and PE, this latter being largely predominant compared to all other sites, seasons and mode of life. On the same way, Fig. 4III shows that mode of life of mussels in Pen-Bé could have an influence on the size of MPs, since no MP larger than 100 μ m was observed in wild mussels. In Aiguillon Bay, no influence of season or mode of life can be noticed. Finally no trend was observed concerning MP color (Fig. 4III). Regarding correlations between type, size and color no trend could be highlighted except that 26/28 MPs made of PE were grey.

3.3. MPs in oysters

3.3.1. Quantitative analysis

The whole abundance of MPs in oysters was about 0.18 ± 0.16 MP per gram of wet tissue and 2.10 ± 1.71 MP per individual ($N = 60$). Quantitative results of each sampling site, season and mode of life of organisms are presented in Fig. 5.

The statistical tests applied to the data showed no significant differences between the groups of oysters related to the sampling location, the season and the mode of life of organisms, whatever the unit of result

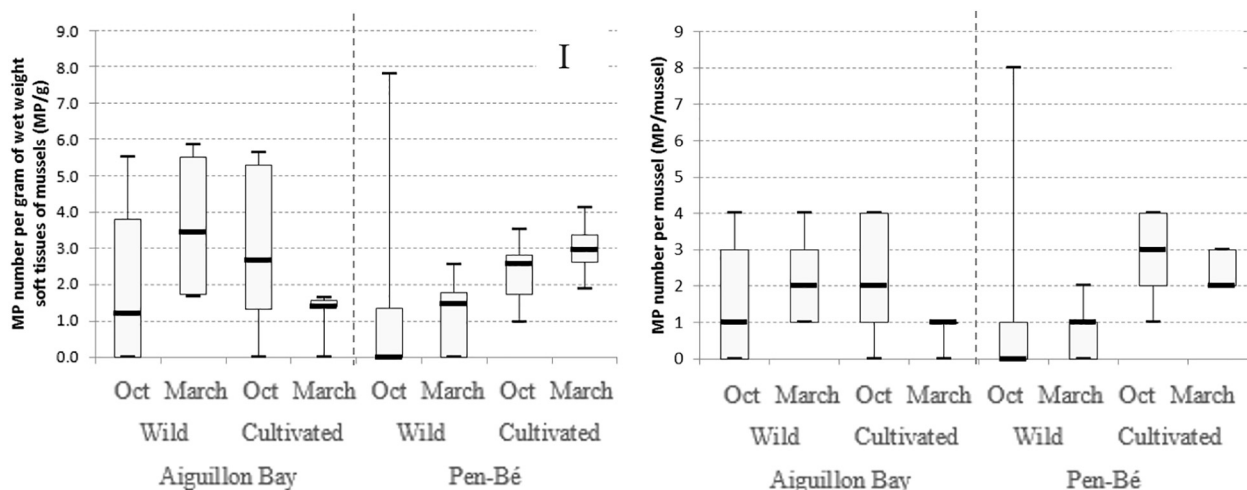


Fig. 2. MPs in mussels related to sampling location, season and mode of life expressed as MP number per gram of wet weight soft tissues of mussels (I) and as MP number per mussel (II). $N = 5$ and box-plots depict minimum, first quartile, median, third quartile and maximum.

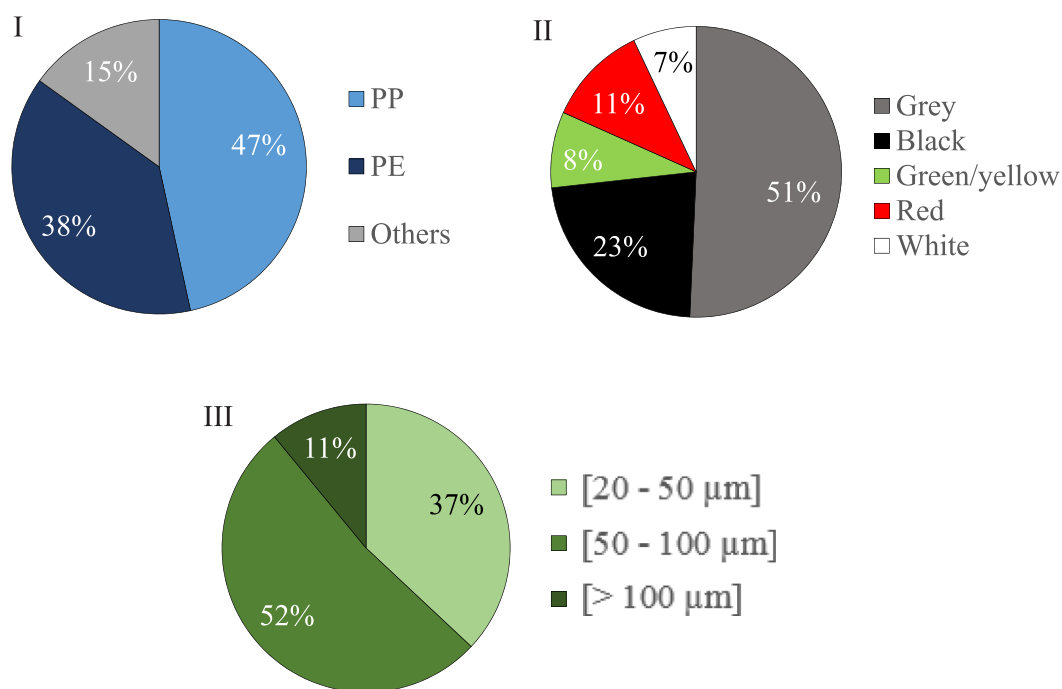


Fig. 3. Qualitative analysis of MPs found in mussels. Distribution of MPs according to: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

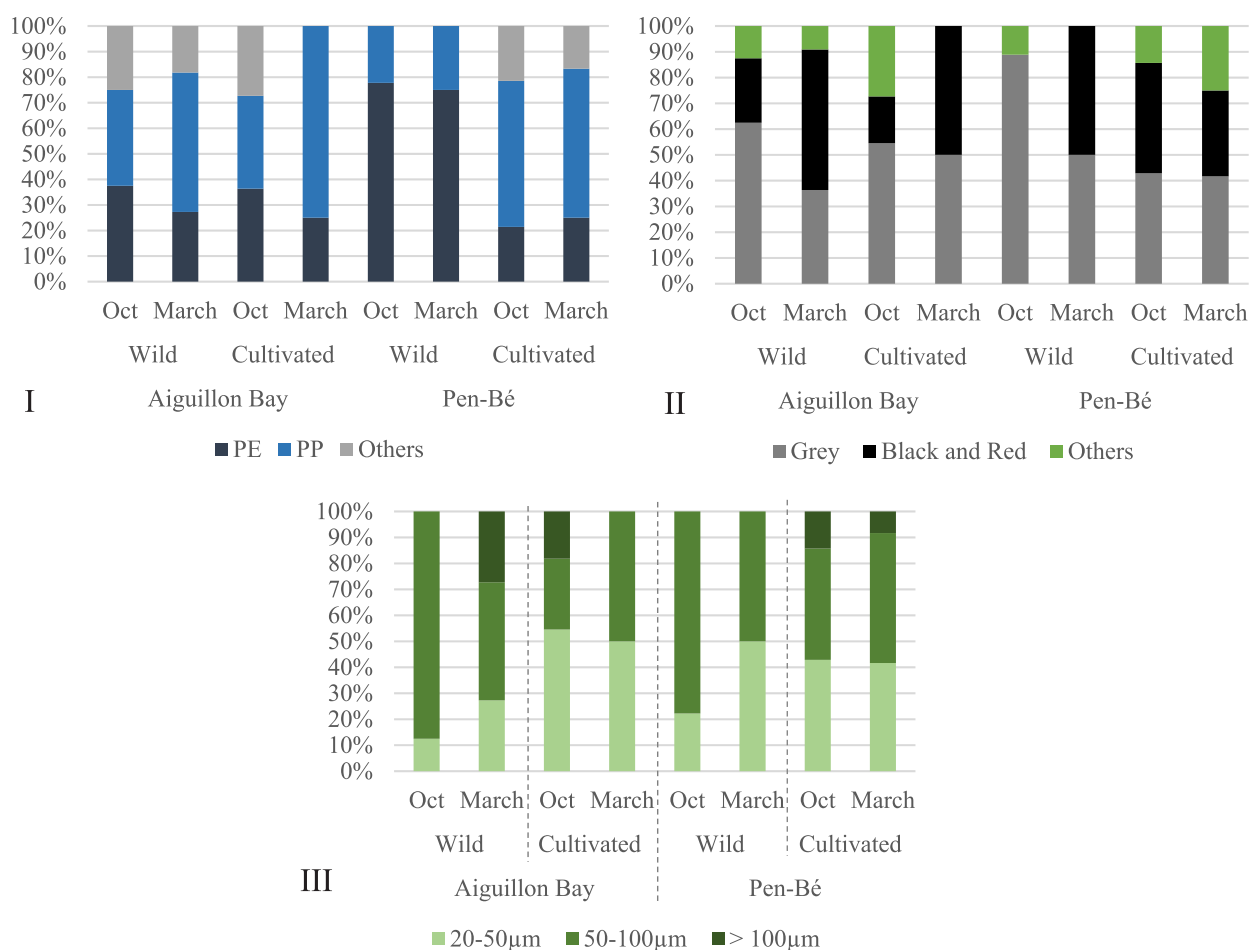


Fig. 4. Distributions of MPs related to the sampling site, the season and the mode of life of mussels, according to: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

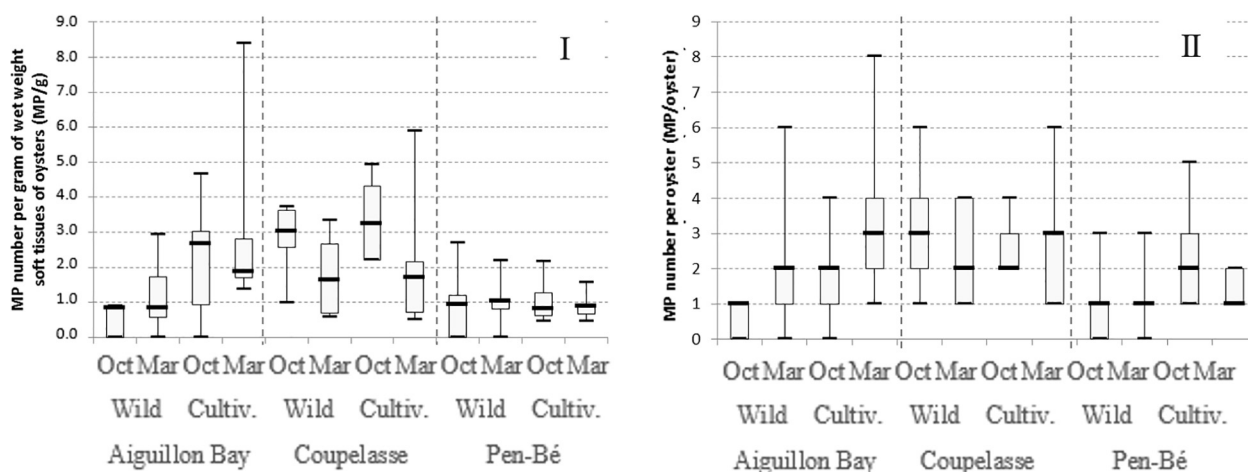


Fig. 5. MPs in oysters related to sampling location, season and mode of life expressed as MP number per gram of wet weight soft tissues of oysters (I) and as MP number per oyster (II). N = 5 and box-plots depicted minimum, first quartile, median, third quartile and maximum.

expression (MP/g or MP/oyster). Without statistical basis, some light effects of sampling locations and modes of life could be evidenced. Hence, 28/30 (93%) cultivated oysters contained MPs vs only 24/30 (80%) of wild oysters. Moreover, a total of 55 MPs were found at Coupelasse vs only 41 at Aiguillon and 30 at Pen-Bé.

3.3.2. Qualitative analysis

The 126 MPs observed in the whole studied oysters were distributed according to their plastic type, their color and their size for a qualitative study (Fig. 6).

Among the 126 MPs found in sampled oysters, seven different plastic types were identified with FT-IR spectroscopy. About half of the MPs were made of PE and a quarter of PP (Fig. 7I). Then, ABS was also frequently found reaching 15% of the recovered MPs. The last 13% were PE-PP copolymers (6.6%), polyester (4.0%), polyisobutylene (PIB; 0.8%) and polystyrene (1.6%). No PVC were found in the oysters,

neither PMMA.

About the shape categorizes from Galgani et al. (2013), the majority of MPs were fragments, with a distribution reaching 79% (99/126), the remaining MPs being filaments. Regarding the color, a lot of MPs found in the oysters were grey-colored, counting for 40% of MPs. Then green, red, black, white and blue MPs were observed reaching 22, 21, 11, 4 and 2% respectively (Fig. 6II).

Fig. 6III shows the distribution of MPs found in oysters related to their size. The highest proportion, up to 53%, corresponded to MPs ranging from 50 to 100 μm . Then, MPs > 100 μm reached 32% and finally 15% were MPs ranging from 20 to 50 μm . The largest particle found in oysters sized 1300 μm (a filament of polyester).

As for mussels, some trends could be highlighted about the influence of the sampling site, the season and the mode of life of oysters (Fig. 7). The patterns of plastic types and colors (Fig. 7I and II) found in wild oysters from Aiguillon bay in October were particular: it is the only

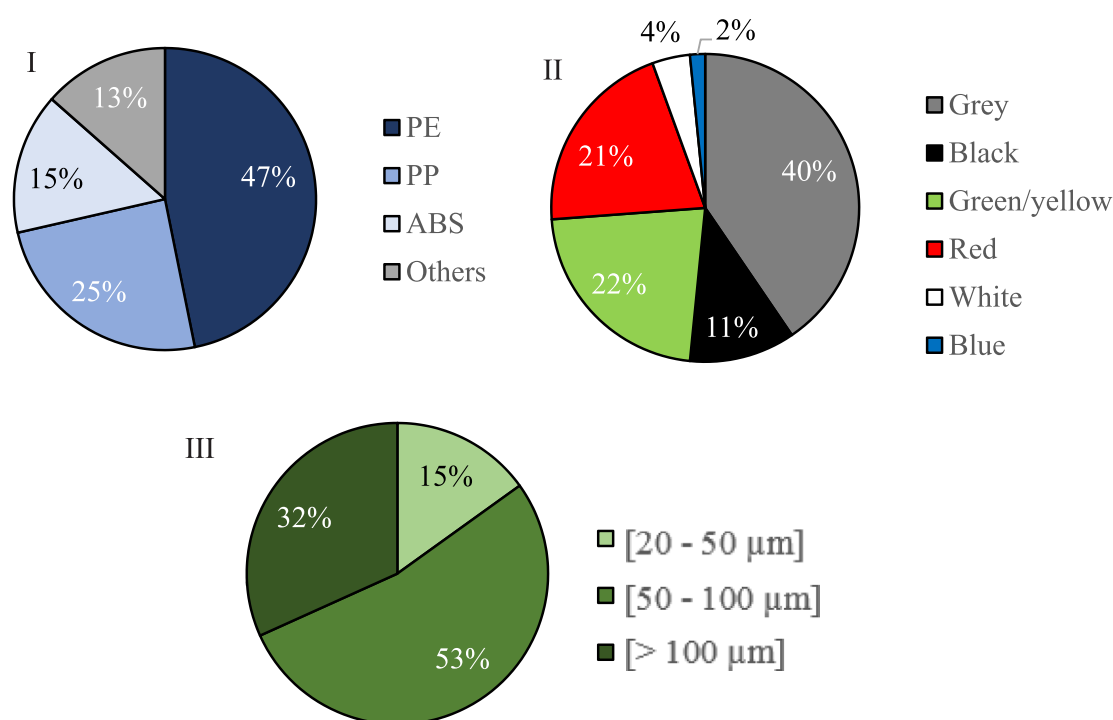


Fig. 6. Qualitative analysis of MPs found in oysters. Distribution of MP according to: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Fig. 7. Distributions of MPs related to the sampling site, the season and the mode of life of oysters, regarding: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Studies dealing with MP contamination of marine bivalve species: location, type of digestion, identification method of MPs, quantity, predominant form and type found in bivalves with the corresponding references.

Species	Location	Digestion	Identification	Quantity	Predominant form (type)	References
<i>Mytilus edulis</i>	Canada	H ₂ O ₂ 30%	Observation	34–178 items/individual	Fibers	Mathalon and Hill (2014)
	China		µFT-IR spectroscopy	0.9–4.6 items/g	Fibers (CP ^a , PET ^a)	Li et al. (2016)
	Belgium	HNO ₃ /HClO ₄	Observation	0.26–0.51 items/g	Fibers	De Witte et al. (2014)
	Europe			0–0.32 items/g	Fibers, fragments	Vandermeersch et al. (2015)
	Germany	HNO ₃ 69%	Raman spectroscopy	0.36 items/g	Fragments	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
	North Sea			0.2–0.3 items/g	Fragments	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	England	Protease	Stereomicroscope	2.5 items/g	Fibers	Catarino et al. (2016)
	France	KOH 10%	µFT-IR spectroscopy	0.24 item/g	Fragments (PE ^a , PP ^a)	Phuong et al. (2017)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Europe	HNO ₃ /HClO ₄	Observation	0.04–0.34 items/g	Fibers, fragments	Vandermeersch et al. (2015)
		HNO ₃ 69%	Observation	0.08–0.16 items/g		
	China	H ₂ O ₂ 30%	µFT-IR spectroscopy	2.1–10.5 items/g	Fibers (PE ^a , PET ^a)	Li et al. (2015)
<i>Crassostrea gigas</i>	France	HNO ₃ 69%	Raman spectroscopy	0.47 items/g	Particles	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
<i>Perna perna</i>	Brazil	HNO ₃ 69%	Polarized light microscope	Not estimated	Irregular shapes	Santana et al. (2016)

^a CP: Cellophane; PET: Polyethylene Terephthalate; PE: polyethylene.

condition where PP particles were absent and other types of plastics represented > 60% of the identified particles. Moreover, for these samples all the particles found being grey-colored. On the contrary, in Pen-Bé, other plastic types than PP and PE were present in very low proportions whereas high proportions of PE were observed in cultivated oysters. Finally, the season could have an effect on the patterns of MP size (Fig. 7III): the proportions of MPs from 20 to 50 μm were not similar between the two studied seasons, they were higher in October.

Studying the correlations between type, size and color, it appears that all MPs in ABS were green while all green-colored MPs, except those made of ABS, were made of PP. Concerning other colors, no trend could be highlighted and no correlation was found implying the size.

4. Discussion

4.1. Quality control and analytical considerations

Associated to the care given to the experiments in order to avoid cross-contamination of samples, different types of blanks were performed. According to the low number of particles observed in the different types of blanks (extraction without mussel or oyster, MilliQ water in plastic bags with and without freezing), and their identification with FT-IR spectroscopy as non-plastic, the cross-contamination of the samples during the whole analysis procedure (storage, sample preparation, FT-IR analysis) could be considered as negligible.

The Table 1 reports literature data on MP contamination of marine bivalves around the world. The use of different methods for sample treatment and MP identification could represent a main source of heterogeneity of the results. Indeed, regarding our results, the ratio of identified MPs/analyzed particles was relatively low, reaching about 6%. Thus, a lot of particles were not identified as plastics and then, were not included in the set of data. This result implies that a microscopic observation is not enough for the determination of plastic-like or non-plastic particles. The identification step in studies about MPs is consequently necessary in order to avoid an overestimation of the MP contents. According to literature (Table 1), only 3 out of 9 studies about MP contents in bivalves achieved the characterization of the plastic nature of particles. Li et al. (2016) found 109 plastic-like particles among 129 particles randomly selected from a total of 1519 microscopically observed particles (ratio higher than 84%). In this latter study, authors used $\mu\text{FT-IR}$ spectroscopy in transmission mode. This mode is not compatible with the cellulose nitrate filters, hence one needs to select the particles and place them on another type of IR-transparent substrate for the identification step. Spectra obtained in transmission mode allow higher research scores than in reflection mode leading probably to a higher proportion of particle identification (Li et al., 2016) which may be one reason for the differences in MP identification rates.

On the other hand, regarding sample treatment by chemical digestion, the use of different reagents as acids, hydroxides or peroxides leads to results hardly comparable (Dehaut et al., 2016). For example, digestions performed with acids were reported as destructing or damaging the surface, the color, the size of some types of MPs (Claessens et al., 2013; Catarino et al., 2016). For these reasons, it seems to not be suitable for the MP contamination assessment in bivalves. Our previous study (Phuong et al., 2017) reported that KOH (10%, m/v) appeared as one of the best reagent for the digestion step among others (NaOH, KOH, HNO_3 or HNO_3 mixed with H_2O_2 , HCl or HClO_4) for an application to the blue mussel *Mytilus edulis*. Moreover, KOH is reported as the best adaptable reagent for the majority of MP types among 15 different tested (Dehaut et al., 2016). Secondly, concerning MP identification, the observation by microscopy is not enough for the characterization of particles as plastic with a strong risk to overestimate the MP content in organisms. Two vibrational microspectroscopic methods (Raman and FT-IR) appeared so far as the most applicable identification methods for MPs in organisms. While Raman spectroscopy allows the

identification of MPs with a smaller size than with $\mu\text{FT-IR}$ spectroscopy (inferior to 50 μm), this latter is a faster method of identification (Kappler et al., 2016).

4.2. Variations of MP contents in bivalves

Beyond variations in analytical procedures, the qualitative and quantitative variations of MP contamination may be related to differences in sampled area pressures and interspecies physiology. Many scientific reports demonstrated that MP quantity is spatially different from pole to pole in global ocean (Cózar et al., 2015). In this study, the quantities of MPs found in mussels and oysters were comparable to quantities depicted in numerous previous studies (De Witte et al., 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Vandermeersch et al., 2015), even if the sample preparation protocols and the analysis methods were different. On the contrary, despite a protocol of analysis close to the one used in this study, Li et al. (2016) obtained levels of MP contamination in mussels sampled from the coast of China on average 10 times higher than the ones obtained here. As the coast of China is known to be a hotspot of MP contamination (Qiu et al., 2015), it appears that these high levels of contamination could be directly related to sampling location and bivalves could then be considered as good bioindicators of MP contamination. Significant differences were moreover noticed between the 22 studied sites covering about 20,000 km coastline. Mathalon and Hill (2014) found also high levels of contamination with 34–178 items per mussel. The difference with our results could be explained once a more by a spatial influence, but also, in this case, partially attributed to differences in the method used for MP analysis. Since the quantification by Mathalon and Hill (2014) was based only on observations, a probable over-estimation of the MP quantities could occur.

In the present study, no significant quantitative difference was observed between the two or three sampling sites studied on the Atlantic coast, whether for mussels or oysters. The anthropogenic pressures of the different sites, the maximum distance of 140 km between them and their oceanic and terrigenous influences did not lead to different MP contaminations. Nevertheless, a tendency of a higher number of MP particles in oysters from Coupelasse (55 items) than Pen-Bé (30 items) was noticed, Aiguillon bay being intermediate (41 items).

Regarding the sampling period, no clear influence on MP contents could be observed. October and March arising both from times of high exposure of organisms (summer pressure and higher filtration rates, remobilization of contaminants stored in the sediments during winter), it will be interesting to further investigate the MP contents in bivalve throughout a farming life cycle including, in this way, seasonal and age variables.

Mathalon and Hill (2014) demonstrated different MP contamination levels between wild and cultivated mussels as it is also suggested in the present study. Even if the differences were not significant, about 90% of pools of cultivated mussels contained MPs while just 60% of wild mussels contained some. The greater contamination of cultivated mussels could be explained by a proximity to MPs coming from the degradation of plastic materials (PE, PP, polyester) used in aquaculture as collectors, ropes, nets and pipes used from the spat collection to on-growing steps. However, Li et al. (2016) showed the opposite trend displaying data on wild mussels being more contaminated than cultivated ones. But the levels of MP contamination in their case were very high compared to all other studies, which prevents any relevant comparison. Regarding oysters, similar results were found as the frequency of MP detection tend to be higher for cultivated oysters (93%) than for wild ones (80%). Even if this observation is less convincing than for mussels, we cannot exclude that oyster cages made in PE could participate to increase oysters' exposure.

From a qualitative point of view, PE and PP were highly predominant among identified plastic particles in all samples. This is consistent with production data as these two polymers account for

43.5% of the annual world production. These two polymers are indeed predominantly sampled in marine waters (Phuong et al., 2016). PS, PE-PP copolymers and ABS were also found in both bivalves representing respectively on average 2.9; 6.0 and 8.2% of the identified particles. This is not surprising for PS as it is the third most produced polymer. Industrial production of PE-PP copolymers has appeared more recently than PE or PP homopolymers (no data on the current production could be found) but they are more and more used for adhesives and packaging applications. Their presence in environmental samples is already scarce and an increase of the concentration can be expected in the future. ABS is less produced and by crossing results of color and type of MPs, all ABS MPs were found green-colored. Hence, it could mean that the ABS contamination in this study originate from a same source. This type of plastic is usually used in toys and in car industry. At last, although PVC production reaches 10% (PlasticsEurope, 2015) of the polymer production, this type of plastic was not found in the mussels and the oysters studied in this present work. It is in accordance with the literature, since PVC MPs have never been observed in bivalves until now. A postulate could be the density of PVC lead to the sinking of MPs which would not be in contact with the mussels or oysters, living in the water column. For all these reasons, the mussels and the oysters could be considered as good indicators of MP contamination of marine waters as shown by Avio et al. (2017) for mussels, even if they are less representative of benthic environments than surface waters.

For both bivalve species, the majority of MPs were fragments and grey-colored suggesting a long-time spent in the environment after fragmentation of wastes (secondary source of contamination). Contrarily to Li et al. (2015, 2016), no plastic pellets (primary origin of contamination) were found in the bivalves.

Finally, regarding the sizes, MPs found in the present study were on average bigger than those found in mussels by Van Cauwenberghe and Janssen (2014). In their study, the predominant size of MPs was in the range inferior to 25 μm instead of MPs ranging from 50 to 100 μm as in the present study. These variations of size could be attributed to a different mussel contamination but also to the different identification procedures used in the studies. Van Cauwenberghe and Janssen (2014) indeed used Raman spectroscopy for MP identification which allows a lower resolution and consequently the identification of MPs with size inferior to 20 μm which is more difficult with $\mu\text{FT-IR}$ spectroscopy.

4.3. Comparison between bivalve species

Considering quantitative results, a great variation of MP quantities per individual were observed between mussels and oysters, with respectively 0.61 ± 0.56 and 2.10 ± 1.71 MP per individual. However, when expressed in MP/g of wet weight soft tissue, the results did not appear so different anymore, with 0.178 ± 0.160 MP/g and 0.228 ± 0.197 respectively for mussels and oysters. Even if the levels of MPs were approximatively one order of magnitude higher than in the present study, this observation seems in accordance with the report of Li et al. (2015). They found in nine commercial bivalves from China, relatively similar MP numbers when expressed in MP/g while significant differences between species were observed for results in MP/item. These results showed that the number of MPs found in different bivalve species could be more or less proportional to the weight/size of organisms. About the differences of MPs/individual between mussels and oysters, the filtration rates could be an explanation since it reaches up to 1.8 L/h (Clausen and Riisgard, 1996) and 5 L/h (Barillé et al., 1997) for mussels and oysters respectively. Oysters filtering twice more water than mussels, they are supposed to be more exposed to MPs leading to a greater bioaccumulation per individual.

From a qualitative point of view, the comparison of Figs. 3I and 6I shows that the predominant plastic type is different for the two studied species. In mussels, PP was predominant while PE particles were the most abundant ones in oysters. This observation may be due to a selective absorption of MPs according to their type or to their position in

the water column. More investigation has to be done to confirm these differences. Another difference was a more important abundance of ABS MPs in oysters (15%) compared to mussels (1%). This higher presence of green colored ABS particles in oysters could be attributed to an alimentary confusion of the oysters. A similar observation was found in the study of De Sa et al. (2015), who showed a confusion between preys and MPs for fish species during laboratory exposures. The confusion could be attributed to the color of MPs.

The comparison of the MP sizes found in both bivalves (Figs. 3III and 6III) showed that the proportion of MPs from 50 to 100 μm were similar between both species (about 50%) and an inversion was observed for the other size ranges with more small MPs (from 20 to 50 μm) observed in mussels whereas a higher proportion of big ones ($> 100 \mu\text{m}$) was found in oysters. These differences in size distributions could be explained by the size of both bivalve species (shell length of 4.42 ± 0.48 and 9.60 ± 1.53 cm respectively for mussels and oysters). The oysters being bigger have also bigger gills and labial pulps which lead probably to the possible ingestion of bigger particles than mussels. For example, Dupuy et al. (1999) reported that mussels most effectively retained particles larger than 20 to 30 μm whereas Cognie et al. (2003) found that the oysters accepted food items larger than 150 μm . The sizes of the biggest MPs found in the bivalves, 400 and 1300 μm respectively for mussels and oysters, illustrate also this hypothesis. Nevertheless, these large particles were probably located in gills since it seems impossible that such fragments could be filtrated and penetrated into the organisms. It would be interesting to study the organotropism in order to answer this point. No correlation was found between the shell length and the MP quantity into each species, and it could also be interesting to link the quantity to the age of the organisms. For the cultivated bivalves, the age could be easily calculated but it would be more difficult for the wild ones. The shell length is not a good indicator of the age since the growth of the organisms is dependent on the local environmental conditions, especially the water quality and the nutrient contents.

Finally, the sampling site, the season, the mode of life or any combinations of these factors were not revealed as relevant influencing factors on the quantitative and qualitative analysis of MPs in bivalves since no systematic effect was highlighted for both species in this study.

5. Conclusion

This study provided interesting quantitative and qualitative results about the MP contamination of two bivalve species, the blue mussel (*Mytilus edulis*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the French Atlantic coast. It contributes to the global MP contamination assessment through a large set of data allowing comparisons between the two species at same locations with the analysis of 180 organisms. Actually, the French Atlantic coast appears to not be under an important MP contamination pressure compared to other sites. Three influencing factors were investigated by the analysis of wild and cultivated bivalves collected at different sampling sites and different seasons. This is the first research work combining these three factors. Even if no evident intra-specific difference was highlighted related to the three influencing factors, some inter-specific differences were found either qualitatively or quantitatively. For example, MP quantity in organisms was higher in oysters than mussels when results were expressed in MP per individual, with values reaching 2.10 ± 1.71 and 0.61 ± 0.56 MP per individual respectively. Once expressed in MP per g of wet weight of soft tissues, quantitative results were quite similar with 0.178 ± 0.160 and 0.228 ± 0.197 items per gram respectively for mussels and oysters. About the qualitative results, different polymers were identified with a high predominance of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) and a noticed recurrence of green acrylonitrile butadiene styrene (ABS) fragments in oysters. Most of the MPs were fragments; about a half of MPs were grey colored. MP size ranging from 50 to 100 μm accounted for about 50% of recovered MPs for both studied species. Up to now, all

studies on MP contamination of bivalves focused on the whole organism. Hence for future works, it would be interesting to study the organotropism of MPs in these filter-feeder species. Are MPs translocated to the tissues or trapped in the gills and/or the digestive tract?

Acknowledgments

We would like to greatly thank the LEX (Laboratoire d'Ecotoxicologie) and the LER PC (Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais) of IFREMER for their advices and their help during the sampling campaigns. This study was partly supported by the region Pays de la Loire through the program Miplaqua. Great thanks to PhuTho college of Medecine and Pharmacy and government of Vietnam for the scholarship of N.N. Phuong.

References

- AFNOR, 1985. Norme Française. Huitres creuses. Dénominations et classification, NF V 45-056. 5 Publication de l'association française de normalisation (AFNOR).
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605.
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30. NOAA. Silver Spring, pp. 530 (September 9–11, 2008).
- Avio, C.G., Cardelli, L.R., Gorbi, S., Pellegrini, D., Regoli, Prof.F., 2017. Microplastics pollution after the removal of Costa Concordia wreck: first evidences from a bio-monitoring case study. *Environ. Pollut.* 227, 207–214.
- Barillé, L., Prou, J., Héral, M., Razet, D., 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212, 149–172.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364 (1526), 1985–1998.
- Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebollo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 248–252.
- Blaskovic, A., Fastelli, P., Cizmek, H., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the Croatian marine protected area of the natural park of Telašćica bay (Adriatic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 114, 583–586.
- Catarino, A.I., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T.B., 2016. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 9999, 1–5.
- Claessens, M., Van Cauwenbergh, L., Vandeghechuchte, M.B., Janssen, C.R., 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 70, 227–233.
- Clausen, I., Riisgard, H.U., 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141, 37–45.
- Cognie, B., Barille, L., Masse, G., Beninger, P.G., 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250, 145–152.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, S.C., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.
- Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environ. Monit. Assess.* 168, 299–304.
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubieda, B., Gálvez, J.A., Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic accumulation in the Mediterranean sea. *PLoS One*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121762>.
- De Sa, L.C., Luís, L.G., Guilhermino, L., 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environ. Pollut.* 196, 359–362.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., Robbins, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 146–155.
- Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 215, 223–233.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 94–99.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 320–330.
- Driss, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., Tassin, B., 2015a. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.* 12, 592–599.
- Driss, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., Laforsch, C., 2015b. Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. *Environ. Chem.* 32.
- Dupuy, C., Le Gall, S., Hartmann, H.J., Beret, M., 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177, 165–175.
- Farrington, J.W., Tripp, B.W., States, U., 1995. International Mussel Watch Project: Initial Implementation Phase, Final Report. U.S. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, Silver Spring, Md (22 p).
- Fischer, E.K., Pagliarola, L., Czech, E., Tamminga, M., 2016. Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments – a case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (Central Italy). *Environ. Pollut.* 213, 648–657.
- Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 156–163.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R.C., VanFraneker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, H., Liebezeit, G., Hanke, G., Werner, S., Galgani, F., Veiga, J.M., Ferreira, M., 2013. Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. EUR – Scientific and Technical Research. Luxembourg Publications Office of the European Union (ISBN: 978-92-79-32709-4 series-ISBN 1831-9424 (online)).
- Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 170–179.
- Gasperi, J., Driss, R., Mirande-Bret, C., Mandin, C., Langlois, V., Tassin, B., 2015. First overview of microplastics in indoor and outdoor air. In: 15th EuCheMS International conference on Chemistry and Environment.
- Graca, B., Szewc, K., Zakarzewska, D., Dolega, A., Szczerbowska-Boruchowska, M., 2017. Sources and fate of microplastics in marine and beach sediments of the Southern Baltic Sea – a preliminary study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-017-8419-5>.
- Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., Van de Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environ. Sci. Technol.* 2016 (50), 2685–2691.
- IFREMER, 1996. Qualité des eaux littorales des pertuis charentais, bilan et diagnostic.
- IFREMER, 1997. L'ostréiculture en baie de Bourgneuf, relation entre la croissance des huîtres *Crassostrea gigas* et le milieu naturel: synthèse de 1986 à 1995.
- IFREMER, 2006. Etude des secteurs du Croisic et de Pen-Bé: estimation des apports continentaux et évaluation des stocks conchyliques.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., et al., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768–771.
- Kaiser, J., 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment. illustrated edition ed. Taylor and Francis Inc. (240 pages).
- Kappler, A., Fisher, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J., Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational micro-spectroscopy: FTIR, Raman or both? *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (29), 8377–8391.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B., Salamatinia, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Sci. Total Environ.* 578, 485–494.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Shi, H., 2015. Microplastics in commercial bivalves from china. *Environ. Pollut.* 207, 190–195.
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., Shi, H., 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environ. Pollut.* 214, 177–184.
- Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 69–79.
- Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environ. Pollut.* 211, 111–123.
- Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, A., Poirier, L., Lagarde, F., 2017. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol set-up and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (Article in press).
- PlasticsEurope, 2015. Plastics – The Facts 2015: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data.
- Qiu, Q., Peng, J., Yu, X., Chen, F., Wang, J., Dong, F., 2015. Occurrence of microplastics in the coastal marine environment: first observation on sediment of China. *Mar. Pollut. Bull.* 98, 274–280.
- Rillig, M.C., 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environ. Sci. Technol.* 46, 6453–6454.
- RNO, 2006. Surveillance du Milieu Marin, Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER).
- Santana, M.F.M., Ascer, L.G., Custódio, M.R., Moreira, F.T., Turra, A., 2016. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. *Mar. Pollut. Bull.* 106, 183–189.
- Schéma d'aménagement et de gestion des eaux du marais breton et du bassin versant de la baie de Bourgneuf, 2014. Plan d'aménagement et de gestion durable des ressources en eau et des milieux aquatiques.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 1973–1976.
- Van Cauwenbergh, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70.

- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10–17.
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., Kotterman, M.J.J., Diogene, J., Bekaert, K., Robbens, J., Devriese, L., 2015. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environ. Res.* 143, 46–53.
- Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E., Thompson, R.C., 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. Open Sci.* 1, 140317.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23 (23), 1031–1033.
- Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146.

HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

Dr Aurore ZALOUK-VERGNOUX

Titre : Évaluation de la contamination environnementale par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, les nanoparticules métalliques et les microplastiques

Résumé :

Ce dossier de demande d'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR) présente un point bilan de mes activités de recherche depuis 13 ans, doctorat inclus. J'ai eu l'opportunité d'évoluer au sein de différents laboratoires de l'Université Paul Cézanne et de l'Université de Provence (Aix-Marseille Université) et je suis à présent Maître de Conférences à l'Université de Nantes, dans l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, au sein du laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160). Le domaine dans lequel s'inscrivent mes travaux de recherche est la chimie de l'environnement, associée à des problématiques écotoxicologiques, ayant pour objectif global d'évaluer les risques environnementaux.

Dans un premier chapitre, ce dossier présente mon curriculum vitae, mes activités d'enseignement et de recherche, ainsi que la valorisation de mes travaux.

Puis, un deuxième chapitre traite de la synthèse des travaux de recherche que j'ai réalisés jusqu'à ce jour sur l'évaluation de la contamination environnementale. Les études menées se positionnent au niveau de la détermination du devenir des contaminants dans l'environnement, de l'exposition et de l'impregnation d'espèces vivantes. Les expérimentations in vivo ont principalement porté sur des nanoparticules métalliques, alors que divers contaminants ont été ciblés lors d'études in situ, comme des composés organiques hydrophobes, des métaux ou encore des microplastiques. Les milieux étudiés étaient continentaux, avec des forêts incendiées, mais aussi estuariens en Loire, et côtiers sur le littoral de la région des Pays de la Loire. Des mesures abiotiques ont été réalisées à la fois sur des sols, des sédiments et des masses d'eau, faisant intervenir des mesures directes ou indirectes, par le biais d'échantillonneurs passifs. Pour ce qui est du compartiment biotique, des végétaux ont été analysés, ainsi que des espèces animales ayant divers intérêts au niveau écosystémique, écotoxicologique, biologique, sanitaire, et/ou socio-économique. La multiplicité des matrices a mené à la mise au point, la validation et l'utilisation de nombreuses méthodes analytiques.

Le troisième et dernier chapitre a pour objectif de présenter mes projets de recherche à venir qui se positionnent au niveau de l'estimation des sources de contamination jusqu'à l'évaluation de la qualité des milieux. Dans la continuité de ce que j'ai réalisé tout au long de mon parcours professionnel, une étude est en cours sur des contaminants qui étaient non étudiés au laboratoire : les éléments terres rares (scandium, yttrium et lanthanides). Par ailleurs, le continuum terre-mer est une problématique que je souhaiterais approfondir pour mieux caractériser les flux provenant du milieu continental et qui impactent les milieux estuariens et côtiers. Pour finir, je souhaiterais développer des méthodes d'évaluation de la qualité des milieux, et notamment un indice d'anthropisation, basés sur la spectroscopie proche infrarouge associée à des outils chimiométriques. Ces méthodes permettraient une évaluation rapide et peu coûteuse grâce à des mesures sur les sédiments et les moules, qui sont de bons intégrateurs de la contamination chimique.