UNIVERSITÉ DE LA POLYNÉSIE FRANÇAISE

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE
ED 469

UMR Écosystèmes Insulaires Océaniens (UMR 241 EIO)
Ifremer / Unité Ressources Marines en Polynésie Française (RMPF)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Tony GARDON

le 07 décembre 2020

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Polynésie française en

Département : **Sciences**
Discipline : **Biologie des populations et écologie CNU 67**
Spécialité : **Biologie marine**

Contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles de Polynésie française et leurs impacts sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera*

Sous la direction de : Gilles LE MOULLAC et Arnaud HUVET
Et des encadrants scientifiques : Jérémy LE LUYER et Ika PAUL-PONT

JURY

Catherine MOUNEYRAC, Professeur, Université Catholique d'Angers, Unité MMS	Rapporteur
Xavier COUSIN, Chargé de recherche, INRAE, UMR GABI	Rapporteur
Magalie Baudrimont, Professeur, Université de Bordeaux, UMR EPOC	Examinatrice
Nabila GAERTNER-MAZOUNI, Professeur, Université de Polynésie Française, UMR EIO	Examinatrice
Serge ANDRÉFOUËT, Directeur de recherche, IRD, UMR ENTROPIE	Examinateur
Gilles LE MOULLAC, Chargé de recherche, Ifremer, UMR EIO	Directeur de thèse
Arnaud HUVET, Chargé de recherche, Ifremer, UMR LEMAR	Directeur de thèse

FINANCEMENTS ET PARTENARIATS

Cette thèse de doctorat est affiliée à l'École Doctorale du Pacifique (ED469) de l'Université de Polynésie Française (UPF). Elle a été réalisée au sein de l'Unité Mixte de Recherche Écosystèmes Insulaires Océaniens (UMR 241 EIO) à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer). Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une convention (N°09793) relative au projet « MICROLAG » (acronyme de MICROplastique dans les LAGons) co-financée par l'Ifremer et la Direction des Ressources Marines (DRM).

Ce projet de recherche a sollicité la participation de plusieurs laboratoires de l'Ifremer :

- Au département Ressources Biologiques et Environnement (RBE) :
  - L'unité Ressources Marines en Polynésie Française (RMPF), UMR 241 EIO, Ifremer centre du Pacifique (Tahiti, Polynésie française) (structure d'accueil),
  - Le Laboratoire Physiologie des Invertébrés (LPI) de l'unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins (PFOM), UMR 6539 LEMAR, Ifremer centre de Bretagne (Brest, France),
- Au département Ressources Physiques et Écosystèmes de fond de Mer (REM) :
  - Le Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM) de l'unité Recherches et Développements Technologiques (RDT), UMR 6539 LEMAR, Ifremer centre de Bretagne (Brest, France),

Ainsi que la collaboration des laboratoires extérieurs :

- Le Cedre (Brest, France),
- L'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM), UMR CNRS 6283, Le Mans Université (Le Mans, France),
- Le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, Boulogne-sur-Mer, France).

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier l'ensemble des membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de clore ces trois années de thèse. Je remercie ainsi le Professeur Catherine Mouneyrac et le Docteur Xavier Cousin pour leur participation en tant que rapporteurs de ce manuscrit ainsi que le Professeur Magalie Baudrimont, le Professeur Nabila Gaertner-Mazouni et le Docteur Serge Andréfouët pour leur participation en tant qu'examinateurs.

Cette thèse a été pour moi une véritable aventure enrichie par de nombreuses rencontres qui m'ont beaucoup apporté tant sur le plan professionnel que personnel. C'est à travers ces quelques lignes que je leur adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

Dans un premier temps, je souhaite vivement remercier mes directeurs de thèse Gilles Le Moullac et Arnaud Huvet. Je les remercie tout d'abord de m'avoir fait confiance et de m'avoir choisi comme candidat pour cette thèse. Merci pour votre soutien, votre complémentarité et tout le temps que vous m'avez consacré. Mes mots ne représenteront jamais assez toute la reconnaissance que j'ai pour vous. Gilles, merci à toi pour ta pugnacité, ta réactivité et ton soutien sans faille. Merci de m'avoir fait confiance dès le début et de m'avoir donné la chance de mener ce projet dans les meilleures conditions. Merci pour toutes ces discussions, ces échanges et la réflexion scientifique qui en découlait. J'ai eu l'honneur d'être le dernier thésard de ta carrière de chercheur. Je te souhaite une bonne et douce retraite. Arnaud, toi en Métropole et moi à Tahiti, les 16 000 kilomètres qui nous séparent n'ont jamais eu raison du temps que tu m'as consacré et de ta disponibilité. Ton implication dans mon encadrement a été exemplaire. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée dans la rédaction, à travers tes conseils, ta minutie et toutes tes connaissances dans la thématique « microplastique ». Je te remercie également d'avoir été un excellent intermédiaire dans toutes les collaborations que nous avons pu avoir en France Métropolitaine. Un grand merci à vous deux pour vos nombreux conseils qui m'ont permis de grandir scientifiquement et humainement.

Dans un second temps, j'adresse mes remerciements à mes encadrants scientifiques Jérémy Le Luyer et Ika Paul-Pont. Merci à Jérémy qui m'a formé et accompagné lors de mes premiers pas en bioinformatique. Je te remercie pour tous les conseils que tu m'as apportés, ton recul et ton regard neuf. Merci pour la personne que tu es, nos discussions enrichissantes, les soirées partagées, et les fous rires ; au-delà d'être un bon encadrant, tu es un bon ami. Merci à Ika, elle aussi très loin d'ici, mais toujours là pour me soutenir, me conseiller et m'aider. Merci à toi pour m'avoir formé à l'échantillonnage de microplastiques et toutes les connaissances et savoir-faire

que tu m'as transmis. Ta rigueur scientifique a été salvatrice aussi bien pour le suivi de la contamination microplastique que pour les approches toxicologiques.

J'adresse également mes remerciements à Mayalen Zubia (UPF, UMR EIO) et David Lecchini (CRIOBE-EPHE, USR 3278) d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci à eux pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Je tiens à remercier à présent toutes les personnes que j'ai pu rencontrer ou non durant ces trois années et qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de thèse.

À Brest…

Merci à Anne-Laure Cassone, ancienne CDD au CNRS-UMR LEMAR, venue de Métropole pour participer à la mission d'échantillonnage Ahe-Manihi. Merci à toi pour tout le temps que tu as consacré à l'analyse des particules. Je remercie également grandement toute l'équipe du laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM) de l'unité Recherche et Développements Technologiques (RDT, Ifremer). Merci pour l'énorme travail que vous avez réalisé. Je tiens tout particulièrement à remercier Maria El-Rakwe pour son implication et tous les échanges que nous avons pu avoir pour mener à bien ce travail. Je remercie aussi Ronan Jezequel et Justine Receveur, du Cedre, pour les analyses chimiques réalisées sur les structures perlicoles en plastique et les lixiviats utilisés pour mon test de toxicité.

Au Mans…

Je remercie Fabienne Lagarde-Abribat, de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) pour le travail qu'elle a réalisé concernant la caractérisation des microplastiques produits à partir des structures perlicoles.

À Boulogne-Sur-Mer…

J'adresse mes remerciements à Alexandre Dehaut et Guillaume Duflos, du Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA, ANSES), qui se sont chargés d'identifier la présence ou non de micro- et/ou nanoplastique dans les keshis issus d'une longue expérimentation.

À Tahiti…

Un grand merci à Patrick Bouisset, responsable du Laboratoire d'Étude et de Surveillance de l'Environnement de l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, IRSN), pour m'avoir procuré de l'azote liquide, sans quoi je n'aurais pu mettre en place mon protocole de production de microplastiques.

Je remercie Benoît Beliaeff, ancien Directeur du Centre Ifremer du Pacifique, de m'avoir accueilli pour réaliser ce beau projet. Je te remercie chaleureusement pour ta bienveillance, ton écoute, tes conseils et toutes les parties de chasse sous-marine que nous avons partagées. Je te souhaite une bonne retraite, beaucoup de plaisir et de réussite à la pêche ! Je tiens également

à remercier Patrick Vidal, actuel Directeur du Centre Ifremer du Pacifique, pour sa bonne humeur, son humour et toutes les discussions enrichissantes. Je te remercie pour ta gestion de la crise sanitaire liée au Covid-19 et les deux mois de prolongation de mon contrat que tu as obtenus auprès de la Direction Scientifique pour que je puisse finir sereinement ma thèse.

Un grand merci à toute l'équipe RMPF du Centre Ifremer du Pacifique, notamment à Claude Soyez qui m'a apporté un immense soutien tout au long de ma thèse, que ce soit pendant les expérimentations ou le traitement de mes échantillons. J'ai toujours pu compter sur toi. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises mais aussi pour m'avoir formé à l'utilisation du MEB. Merci pour ton épicurisme et tous les bons moments partagés. Ensuite, un gros big up à Virgile Quillien, merci à toi l'ami, rentré au bercail après quatre années passées au fenua. Merci pour ta formation au traitement des échantillons RNA-Seq et pour toute ton implication dans mon projet de thèse. Je te remercie aussi pour ces sorties pêche et les soirées continues. Merci à Caline Basset pour avoir préparé une grande quantitié d'échantillons à l'analyse histologique. Je remercie aussi Céline Reisser, ancienne chargée de recherche à l'Ifremer du Pacifique, pour son aide à la rédaction de mon premier article scientifique. Un grand merci également à Manaarii Sham-Koua, Lauriane Bish, Mayalen Maihota et Vincent Vanaa pour leur approvisionnement en microalgues et la main d'œuvre qu'ils m'ont apportée lors de mes expérimentations. Mes remerciements s'adressent également à l'équipe logistique, les membres du sécrétariat et de l'administration.

Aussi, je remercie grandement William et Odette pour leurs excellents repas du midi à la cafétéria mais surtout pour leur grand cœur et tous les bons moments passés à leurs côtés. Un grand merci aussi aux gardiens du centre pour leur bonne humeur et leur humour : Stephen, Jean-Yves, Joël, Tamu, et Gérard. Merci aux collègues, Pierre, Ific, Piripi, Kenzo, pour toutes ces parties de Catan, de pêches, de surf, et les supers soirées que nous avons partagées.

Merci à toi, Nathanaël Sangare, pour les belles sessions surf et tous les moments partagés à tes côtés. Tu nous as quittés beaucoup trop tôt et ta disparition aura été une véritable épreuve. Tu resteras à jamais dans nos cœurs, repose en paix bro. Jah love.

Je remercie ma famille et notamment mes parents à qui je dois tout. Merci de m'avoir offert ce qui était nécessaire pour en arriver là. Merci pour votre soutien inconditionnel au cours de cette thèse, mais également tout au long de mes études, je remercie la vie de vous avoir comme parents. Enfin, je réserve mes derniers remerciements à Margaux, qui m'a accompagné et encouragé tout au long de cette belle aventure parsemée d'embuches. Tu as toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments, pour me remonter le moral quand ça n'allait pas. Merci du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté et ton soutien sans faille.

Mauru'uru roa et bonne lecture…

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE

Articles publiés

Gardon Tony, Reisser Celine, Soyez Claude, Quillien Virgile, Le Moullac Gilles (2018). **Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*.** *Environmental Science & Technology*, 52, 5277-5286 (10p.).
Publisher's official version: https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00168.

Gardon Tony, Huvet Arnaud, Paul-Pont Ika, Cassone Anne-Laure, Sham Koua Manaarii, Soyez Claude, Jezequel Ronan, Receveur Justine, Le Moullac Gilles (2020). **Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*.** *Water Research*, 179, 115890 (11p.).
Publisher's official version: https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115890.



Gardon Tony, Morvan Lucie, Huvet Arnaud, Quillien Virgile, Soyez Claude, Le Moullac Gilles, Le Luyer Jérémy (2020). **Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*.** *Environmental Pollution*, 266, 115180 (9p.).
Publisher's official version: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115180.



Article soumis

Gardon Tony, El Rakwe Maria, Paul-Pont Ika, Le Luyer Jérémy, Thomas Léna, Prado Enora, Kada Boukerma, Cassone Anne-Laure, Quillien Virgile, Soyez Claude, Costes Louis, Crusot Margaux, Dreano Catherine, Huvet Arnaud, Le Moullac Gilles. **Microplastics contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia.** *Environment International*.



Articles en rédaction

Gardon Tony, Fabienne Lagarde, Paul-Pont Ika, Soyez Claude, Le Moullac Gilles, Huvet Arnaud. **The real challenge of producing more realistic microplastics to conduct relevant ecotoxycological experiments.** *Analytical Methods – Communication*.

Gardon Tony, Le Luyer Jérémy, Paul-Pont Ika, Dehaut Alexandre, Duflos Guillaume, Lagarde Fabienne, Quillien Virgile, Bish Lauriane, Soyez Claude, Le Moullac Gilles, Huvet Arnaud. **Microplastics as a threat for pearl-farming in French Polynesia.** *Science Advances*.

Communications orales

Atelier PERLICYCLAB. « Quels impacts des déchets plastiques sur la qualité du milieu marin ? ». Tony Gardon, intervenant Ifremer. Salle du gouvernement – Papeete, Polynésie française, 12 décembre 2017.

Les Doctoriales de Polynésie française 2018. « Impact des micro- et nanoplastiques sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera* ». Amphithéâtre A3 – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 2-3-4 mai 2018.

Les Doctoriales de Polynésie française 2019. « Impact des micro- et nanoplastiques sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera* ». Amphithéâtre A3 – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 13-14-15 mai 2019.

Forum de la perliculture 2019. « Contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles polynésiens et leurs effets sur l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* ». Tony Gardon, intervenant Ifremer. IJSPF – Pirae, Polynésie française, 22 octobre 2019.

Conférences de la Recherche en Polynésie française. « Contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles polynésiens et leurs effets sur l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* ». Amphithéâtre E – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 23 janvier 2020.

Visioconférence avec l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (organisme commun à l'Assemblée nationale et au Sénat) saisi par la commission de l'aménagement du territoire et du développement durable du Sénat d'une mission d'information sur la pollution plastique. Mr Philippe Bolo, député de Maine-et-Loire, et Mme Angèle Préville, sénatrice du Lot, nommés rapporteurs. « La pollution plastique en Polynésie française et son impact sur l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* ». Tony Gardon et Gilles Le Moullac, intervenants Ifremer. Ifremer Centre du Pacifique – Vairao, Polynésie française, 12 juin 2020.

Prix

Prix du meilleur poster – Les Doctoriales de Polynésie française 2018. Amphithéâtre A3 – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 2-3-4 mai 2018.

Seconde meilleure présentation – Les Doctoriales de Polynésie française 2019. Amphithéâtre A3 – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 13-14-15 mai 2019.

Premier prix Europcar 2019 – 2ème édition des Conférences de la Recherche en Polynésie française. Amphithéâtre E – Université de Polynésie française, Punaauia, Polynésie française, 23 janvier 2020.

Articles journalistiques

Tahiti Infos, 28 janvier 2020. À la une : « Microplastiques : les atolls perliers malades ». Actualités locales : « Comme un poison dans l'eau » et interview de Tony Gardon, doctorant à l'Ifremer et affilié à l'École doctorale du Pacifique, 2p.

Encadrement de stages

Vairei Tepuhiarii, étudiante en 3ème année de Licence Science de la Vie (L3) – Université de Polynésie française. « Traitement et analyse d'échantillons pour l'évaluation de la contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles polynésiens ». Stage effectué du 02 juillet au 24 août 2018. Maître de stage : Gilles Le Moullac, Chercheur, Ifremer centre du Pacifique ; Co-encadrant : **Tony Gardon**, Doctorant, Ifremer centre du Pacifique.

Hotuatua Teururai, étudiante en 2ème année de Licence Science de la Vie (L2) – Université de Polynésie française. « Traitement et analyse d'échantillons pour l'évaluation de la contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles polynésiens ». Stage effectué du 01 juillet au 28 juillet 2019. Maître de stage : Gilles Le Moullac, Chercheur, Ifremer centre du Pacifique ; Co-encadrant : **Tony Gardon**, Doctorant, Ifremer centre du Pacifique.

Éloïse Courbin, étudiante en 3ème année de formation d'Assistant Ingénieur en Biologie-Biochimie-Biotechnologies (L3) – Université Catholique de Lyon. « Étude de l'activité chitinolytique de bactéries marines pour la dégradation de la chitine de cuticule de crustacé ». Stage effectué du 01 avril au 9 août 2019. Maître de stage : Denis Saulnier, Chercheur, Ifremer centre du Pacifique ; Co-encadrant : **Tony Gardon**, Doctorant, Ifremer centre du Pacifique.

Lucie Morvan, étudiante en 2ème année de Master Sciences pour l'Environnement – parcours Gestion de l'Environnement et Écologie du Littoral (M2) – Université de La Rochelle. « Réponse transcriptomique aux microplastiques chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* ». Stage effectué du 14 février au 14 juillet 2019. Maître de stage : Jérémy Le Luyer, Chercheur, Ifremer centre du Pacifique ; Co-encadrant : **Tony Gardon**, Doctorant, Ifremer centre du Pacifique.

Activité de révision

Bonnard Michel, Boury Bruno, Parrot Isabelle (2019). **Key Insights, Tools, and Future Prospects on Oyster Shell End-of-Life: A Critical Analysis of Sustainable Solutions.** *Environmental Science & Technology*, 54, 1, 26-38.
Publisher's official version: https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03736.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS 12
TABLE DES ABRÉVIATIONS 16
AVANT-PROPOS 18

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE 22
1. Les matières plastiques : entre révolution industrielle et catastrophe écologique .. 22
1.1. Histoire de l'industrie plastique 22
1.2. Fabrication et classification des polymères synthétiques 23
1.3. Du polymère à la matière plastique 24
1.4. Domaines d'application et croissance de l'industrie plastique 25
1.5. Gestion des déchets plastiques 26
1.6. Pollution plastique de l'environnement et solutions alternatives 28
2. Les océans comme destination finale des déchets plastiques 29
2.1. Origine des déchets plastiques 29
2.2. Distribution spatiale et accumulation 30
2.3. Fragmentation, formation et classification des débris plastiques 32
3. Impacts écologiques des débris plastiques 34
3.1. Enchevêtrement 34
3.2. Ingestion 35
3.3. Autres interactions 38
4. Enjeux face à la prédominance des microplastiques 40
4.1. Les microplastiques : définition 42
4.2. Origines des microplastiques dans l'environnement marin 42
5. Évaluation de la contamination en microplastiques 44
5.1. Méthodologie d'échantillonnage 44
5.2. Purification des échantillons 47
5.3. Caractérisation et quantification des particules 48
5.4. Identification des particules 49
5.5. Contamination des échantillons *in situ* 52
5.6. Concentrations en microplastiques dans les matrices environnementales 53
6. Impacts des micro- et nanoplastiques sur les organismes aquatiques en conditions contrôlées de laboratoire 58
6.1. Ingestion et devenir des micro- et nanoplastiques dans l'organisme 59
6.2. Effets biologiques des micro- et nanoplastiques 64
7. Contamination microplastique dans les produits de la pêche et de l'aquaculture : un risque pour la santé humaine ? 72

CHAPITRE II : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLÉMATIQUE DU PROJET DE THÈSE 76

1. L'huître perlière *Pinctada margaritifera* : un modèle biologique d'intérêt écologique et économique en Polynésie française 76

1.1. Systématique et distribution géographique 76

1.2. Morphologie et anatomie 77

1.3. Nutrition 79

1.4. Reproduction et cycle de développement 80

1.5. Service écosystémique et sentinelle écologique 82

1.6. La perliculture en Polynésie française : deuxième ressource économique du territoire 82

2. L'écosystème lagonaire et l'économie de la filière perlicole menacés par la pollution plastique 85

2.1. Crise économique de la perle 85

2.2. La perliculture : source spécifique de déchets plastiques 87

3. Objectifs de la thèse 89

CHAPITRE III : ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DE LA CONTAMINATION EN MICROPLASTIQUES DANS LES LAGONS PERLICOLES POLYNÉSIENS 94

1. Préambule 94

2. Article 1 : Microplastics contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia 101

3. Conclusion et perspectives 142

CHAPITRE IV : IMPACT DES MICROPLASTIQUES STANDARDISÉS DE LABORATOIRE SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE 144

1. Préambule 144

2. Article 2 : Microplastics affect energy balance and gametogenesis in the pearl oyster *Pinctada margaritifera* 149

3. Article 3 : Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* 168

4. Conclusion et perspectives 202

CHAPITRE V : IMPACT DES MICROPLASTIQUES PRODUITS À PARTIR DE STRUCTURES PERLICOLES SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE 204

1. Préambule 204

2. Article 4 : Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera* 212

3. Article 5 : The real challenge of producing more realistic microplastics to conduct relevant ecotoxicological experiments 246
4. Article 6 : Microplastics as a threat for pearl-farming in French Polynesia 260
5. Conclusion et perspectives 284

CHAPITRE VI – DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 290
1. La contamination microplastique dans les lagons perlicoles, une menace pour l'huître perlière et l'écosystème lagonaire 291
2. Les microplastiques impactent l'huître perlière à différentes échelles biologiques suite à l'altération de son métabolisme énergétique 294
3. La qualité de la perle impactée par les microplastiques 303
4. Des expérimentations toujours plus réalistes 305
5. Vers le recyclage et la substitution des plastiques perlicoles 310
6. De nouvelles pistes à explorer 311

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 315
ANNEXES 343

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures (hors publications)

Figure 1. Évolution de la production de plastique mondiale et européenne entre 1950 et 2016 et répartition de la demande de plastique par secteur d'activité au sein de l'Union Européenne . 26

Figure 2. Gestion des déchets plastiques entre 1980 et 2015 27

Figure 3. Proportion des déchets plastiques non-gérés et gérés de manière inadéquate selon les pays du monde (données 2010) 28

Figure 4. Répartition globale des déchets plastiques non-gérés et gérés de manière inadéquate (données 2010) 30

Figure 5. Concentrations des débris plastiques à la surface des océans 32

Figure 6. Classifications proposées dans la littérature et les rapports institutionnels afin de définir les différentes catégories de débris plastiques en fonction de leur taille 34

Figure 7. Exemples d'enchevêtrement observés chez une tortue marine et un phoque emmêlés dans un filet de pêche abandonné..... 35

Figure 8. Phénomènes d'ingestion de matières plastiques observés chez un oiseau marin retrouvé mort l'estomac rempli de débris divers et chez une tortue marine tentant d'avaler un sac en plastique..... 36

Figure 9. Organismes marins potentiellement impactés par les différentes classes de taille des débris plastiques. 37

Figure 10. Phénomènes « d'étouffement » occasionés par les déchets plastiques dans des écosystèmes tels que les mangroves, les récifs corraliens, et le fond des océans 40

Figure 11. Modélisation de la densité de plastique flottant à la surface des océans en fonction de la masse et du nombre de débris selon 4 classes de tailles (0,33-1,00 mm ; 1,01-4,75 mm ; 4,76-200 mm et > 200 mm) 41

Figure 12. Illustrations de microplastiques primaires et secondaires 43

Figure 13. Équipements utilisés pour l'échantillonnage de microplastiques dans les eaux de surface et la colonne d'eau 46

Figure 14. Représentation de deux fibres similaires mais de nature différente identifiée par FTIR : l'une comme polyacrilique et l'autre comme coton..... 49

Figure 15. Spectres Raman et FTIR des polymères synthétiques standards les plus courants 51

Figure 16. Schéma illustrant les effets biologiques que peut occasionner l'ingestion de micro- et nanoplastiques (MNP) à différentes échelles de l'organisme..... 59

Figure 17. Photographies illustrant l'ingestion de nano- et microplastiques fluorescents variant selon la taille des particules chez des larves d'huîtres (*Crassostrea gigas*) agées de 3 jours (post-fécondation) 60

Figure 18. Photographies du rotifère *Brachionus plicatilis* après l'ingestion de nano- et microbilles de polystyrène fluorescentes de 0,05 ; 0,5 et 6 µm..... 62

Figure 19. Ingestion et dépuration de nanobilles de polystyrène 24 et 250 nm radiomarquées au C^{14} chez la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*)..... 63

Figure 20. Effets de l'exposition aux microplastiques sur l'expression de *gst-4::GFP* (*glutathione S-transférase 4::Green Fluorescent Protein*) chez *Caenorhabditis elegans* (souche transgénique CL2166) 68

Figure 21. Anatomie de l'huître perlière *P. margaritifera* (valve droite) 78

Figure 22. Nutrition de l'huître perlière *P. margaritifera*..... 80

Figure 23. Cycle de développement de l'huître perlière (*P. margaritifiera*). 81

Figure 24. Schéma illustrant le principe d'une greffe chez l'huître perlière (*P. margaritifera*) pour l'obtention d'une perle de culture..... 84

Figure 25. Évolution du poids total de perles exportées et du prix de la perle entre 1972 et 2014 86

Figure 26. Schéma illustrant le principe de fragmentation des structures d'évelage perlicole soumisent aux facteurs envrironnementaux (*i.e.* ensoleillement, houle, vent) 89

Figure 27. Schéma illustrant les 4 objectifs de la thèse 91

Figure 28. Répartition des stations d'échantillonnage dans les lagons perlicoles sélectionnés pour l'évaluation et la caractérisation de la contamination en microplastiques..... 96

Figure 29. Panel de photographies illustrant les débris plastiques collectés sur les plages de Takaroa..... 97

Figure 30. Exemples de matières organiques retrouvées dans un échantillon d'eau de surface 98

Figure 31. Chitine résiduelle retrouvée à la suite du protocole de digestion..... 99

Figure 32. Échantillon digéré, filtré puis scanné à haute résolution pour la quantification des particules *via* le logiciel imageJ. 99

Figure 33. Microbilles de polystyrène (micro-PS) de diamètre 6 et 10 µm 144

Figure 34. Aperçu des micro-PS comptabilisées à l'entrée des bacs d'exposition 146

Figure 35. Analyse d'échantillons au compteur à particules..... 146

Figure 36. Suivi de la distribution des micro-PS à l'entrée des bacs d'exposition (condition 25 $\mu g.L^{-1}$)..... 147

Figure 37. Comparaison entre les concentrations de microplastiques utilisées dans les études d'exposition et les concentrations environnementales mesurées..... 205

Figure 38. Distribution de la taille des particules de polystyrène (PS) produite et utilisées dans les travaux de Schür *et al.* (2020)..... 209

Figure 39. Photographies au microscope électronique à balayage (MEB) réalisées à la surface de deux perles récoltées chez des huîtres perlières exposées aux MNP perlicoles 287

Figure 40. Observation d'une particule incluse dans la matière minérale d'un keshi récolté dans une huître perlière exposée aux MNP perlicoles dont les caractéristiques semblent correspondre aux microplastiques produits à partir du cordage 288

Figure 41. Comparaison entre les concentrations moyennes en microplastiques mesurées dans les eaux de surface (> 335 µm) des atolls de Ahe, Manihi et Takaroa et celles mesurées dans différents sites dans le monde..... 293

Figure 42. Comparaison entre les concentrations en microplastiques mesurées dans les tissus de l'huître perlière (*P. margaritifera*) échantillonné à Ahe, Manihi et Takaroa et celles mesurées chez d'autres espèces de bivalves marins dans le monde 294

Figure 43. Projection des statuts métaboliques de l'huître perlière (*P. margaritifera*) selon les conditions microplastiques testées expérimentalement en conditions contrôlées de laboratoire d'après le concept de tolérance au stress limité par l'énergie décrit par Sokolova (2013) 302

Figure 44. Schéma illustrant l'importance de la nature des particules plastiques utilisées en écotoxicologie dans le degré de compréhension des mécanismes de toxicité et la notion de pertinence écologique 306

Figure 45. Représentation schématique du processus de fragmentation naturelle d'une sphère en plastique..... 308

Liste des tableaux (hors publications)

Tableau 1. Densité des principaux polymères retrouvés dans les océans 31

Tableau 2. Concentrations en microplastiques dans l'eau de mer à travers le monde 54

Tableau 3. Concentrations en microplastiques dans les sédiments marins à travers le monde 56

Tableau 4. Concentrations en microplastiques dans les organismes marins à travers le monde 57

Tableau 5. Classification taxonomique de l'huître perlière *P. margaritifera* var. *cumingii* 76

TABLE DES ABRÉVIATIONS

BPA	Bisphénol A
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marine
DDT	Dichlodiphényl-trichloroéthane
DEG	Gène(s) différentiellement exprimé(s)
DRM	Direction des Ressources Marines
EPS	Polystyrène expansé
EVA	Éthylène vinyl acétate
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HCB	Hexachlorobenzène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl	Acide chlorhydrique
HCH	Hexachlorocyclohexane
HDPE	Polyéthylène à haute densité
HNO_3	Acide nitrique
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
KOH	Hydroxyde de potassium
LDPE	Polyéthylène basse densité
Micro-PS	Microbilles de polystyrène
MO	Matière organique
MP	Microplastique(s)
MNP	Micro- et nanoplastique(s)
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium

NP	Nanoplastique(s)
PA	Polyamides
PBDE	Éthers diphényliques polybromés
PC	Polycarbonate
PCB	Polychlorobiphényles
PE	Polyéthylène
PET	Polyéthylène téréphtalate
PES	Polytetrafluoroethylene
PHA	Polyhydroxyalcanoate
PHB	Polyhydroxybutyrate
PHBV	Polyhydroxybutyrate valérate
PHV	Polyhydroxybutyrate
PLA	Acide polylactique
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
POP	Polluants organiques persistants
PP	Polypropylène
PS	Polystyrène
PTFE	Polyétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
PUR	Polyuréthane
PVC	Polychlorure de vinyle
Pyr-(GC/MS)	Pyrolyse par GC/MS
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
TD-(GC/MS)	Désorption thermique par GC/MS

AVANT-PROPOS

La Polynésie française et plus particulièrement les lagons perlicoles font face à une pollution plastique qui suscite depuis quelques années une grande préoccupation de la part du gouvernement local. En effet, après plus de 30 ans de perliculture, les lagons perlicoles sont devenus le siège d'une pollution massive de macrodéchets associée à cette activité. Ce gisement de déchets est majoritairement composé de plastique. Le vieillessement constant de ces matières en plastique fragilise leur intégrité et conduit à la production de microparticules de plastique appelées « microplastiques » (MP, < 5 mm). Bien que la loi du Pays n° 2017-16 oblige à présent les perliculteurs à retirer leurs structures d'élevage des lagons et à nettoyer leurs concessions maritimes, la contamination des lagons par les MP pose question. L'huître perlière (*Pinctada margaritifera*), dont l'élevage est à l'origine de cette pollution, représente la deuxième ressource économique de Polynésie française *via* le commerce de perles et de nacres. Cependant, cette espèce d'intérêt économique est d'autant plus vulnérable à la pollution du milieu par les MP puisqu'il s'agit d'un organisme filtreur-suspensivore. Désireuse d'anticiper et d'appréhender cette menace qui pèse sur la filière perlicole, l'huître perlière et l'écosystème lagonaire, la DRM a co-financé ce projet de thèse afin d'apporter des éléments de réponse et faciliter l'aide à la décision des instenses locales.

Dans ce contexte, le présent manuscrit relate l'ensemble des travaux de recherche effectués du 01/10/2017 au 30/09/2020 dans le cadre du projet MICROLAG. Cette thèse a été réalisée sous la co-direction du Docteur Gilles LE MOULLAC (UMR 241 EIO, Ifremer Centre du Pacifique) et du Docteur Arnaud HUVET (UMR 6539 LEMAR, Ifremer de Bretagne) ; et co-encadrée par le Docteur Jérémy LE LUYER (UMR 241 EIO, Ifremer Centre du Pacifique) et le Docteur Ika PAUL-PONT (UMR 6539 LEMAR, CNRS). Elle vise à **évaluer la contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles de Polynésie française** et **leurs impacts sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera*.** Pour répondre à ces objectifs, ce manuscrit s'articule autour de six chapitres.

Le *Chapitre I* est consacré à un état de l'art qui détaille les connaissances actuelles sur la pollution plastique dans le monde, l'impact écologique de ces débris dans l'environnment marin et les enjeux relatifs à la contamination microplastique. Les méthodes employées pour évaluer cette contamination sont ensuite développées avant d'aborder l'impact des MP mais aussi des nanoplastiques (NP) sur les organismes marins en conditions contrôlées de laboratoire. Le *Chapitre II* aborde le contexte scientifique du projet de thèse tout en détaillant les objectifs qui y sont associés. Afin d'évaluer la contamination microplastique dans les lagons perlicoles, des campagnes d'échantillonnages d'eau et d'huîtres perlières ont été menées pour mieux apprécier le degré d'exposition aux MP et la contamination des cheptels en élevage. Cette tâche a

nécessité la collaboration des laboratoires de l'Ifremer à Brest et du LEMAR (UMR 6539) qui possèdent l'expertise et les équipements pour l'analyse des échantillons prélevés. En effet, les polymères plastiques présents ont été identifiés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) grâce aux développements récents réalisés dans le cadre du projet Ifremer Merlin "Microplastiques". Ces travaux sont présentés dans le *Chapitre III* sous la forme d'un article soumis dans la revue scientifique *Environment International*. Concernant l'impact des MP sur *P. margaritifera*, deux expérimentations *in vivo* ont été menées en conditions contrôlées de laboratoire. Une première exposition des huîtres perlières a été réalisée pour décrypter les processus métaboliques et transcriptomiques impliqués dans la réponse au stress MP impliquant des MP modèles (microbilles standardisées). Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans le *Chapitre IV* sous la forme de deux articles publiés respectivement dans les revues *Environmental Science & Technology* et *Environmental Pollution*. Tirant profit des travaux précédents (*Chapitre IV*) et des données de contamination microplastique obtenues dans les lagons perlicoles (*Chapitre III*), une seconde expérimentation a ensuite été réalisée pour se rapprocher le plus possible d'une réalité environnementale lagonaire impliquant des micro- et nanoplastiques (MNP) issus des structures perlicoles en plastique à des concentrations massiques *in situ*. Cette approche constitue le volet innovant de ce travail de thèse puisqu'elle implique (1) une approche toxicologique visant à caractériser le potentiel de toxicité chimique des structures perlicoles dans l'objectif (2) de mettre en place un protocole de production de MP issus de ces stuctures et (3) d'en évaluer les effets sur l'huître perlière. Ainsi, en plus des réponses métaboliques et transcriptomiques préalablement testées, des réponses fonctionnelles en lien avec les processus de biominéralisation et notamment la qualité de la perle ont été obtenues. L'ensemble de ces travaux est présenté dans le *Chapitre V* sous la forme d'un article publié dans la revue *Water Research* (1) et de deux articles en cours de rédaction pour des soumissions prévues dans les revues *Analytical Methods – Communication* (2) et *Science Advances* (3). Enfin, une discussion générale est abordée dans le *Chapitre VI* intégrant l'ensemble des résultats marquants ainsi que les perspectives de ce projet de recherche.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Les matières plastiques : entre révolution industrielle et catastrophe écologique

1.1. Histoire de l'industrie plastique

L'Homme n'a cessé d'imaginer et de concevoir des matériaux présentants des propriétés et des avantages que jamais les matériaux naturels ne pourraient égaler. Les matériaux traditionnels (*e.g.* métaux, céramique) et les matières organiques (*e.g.* bois, cuir, lin, laine) ont longtemps dominé les innovations « industrielles ». Cependant, la demande croissante de matières premières et le besoin de diversifier leurs propriétés au cours du XIXème siècle, marquent le début du développement de nouveaux produits : les matières plastiques. Faisant l'objet d'innovations pendant plus de 100 ans, le plastique a façonné les sociétés contemporaines et notre mode de vie. Les matières plastiques sont le plus souvent des matériaux de synthèse dérivés de combustibles fossiles (pétrole, gaz ou charbon) qui résultent des avancées scientifiques dans le domaine de la chimie. Cependant, le développement de matériaux entièrement synthétiques qualifiés de « plastiques modernes » a débuté par l'utilisation de matériaux naturels ou chimiquement modifiés (*e.g.* nitrocellulose, caoutchouc) (Gilbert, 2017).

La première matière plastique remonte à celle d'Alexander Parkes en 1856, qui révéla publiquement sa création (la « Parkesine ») lors de l'exposition universelle de Londres en 1862 (Gilbert, 2017). Sa composition d'origine organique (*i.e.* nitrocellulose et camphre alcoolisé) a ensuite été améliorée par John Wesley Hyatt qui inventa en 1868 le celluloïd, qui, une fois chauffé, peut être modelé et conserver sa forme une fois refroidi (polymère thermoplastique) (Feldman, 2008). Cette matière servait initiallement de substitut à l'ivoire dans les boules de billard mais fût surtout utilisée pour la production des premiers films souples dans le secteur de la photographie et du cinéma (Friedel, 1979 ; Feldman, 2008). Hautement inflammable et explosive, la nitrocellulose a laissé place au formaldéhyde qui incarna progressivement l'avancée technologique du plastique. Cette nouvelle matière mélangée aux caséines (protéines du lait) a permis la fabrication de la galalithe (polymère thermodurcissable) découverte en 1893 par Auguste Trillat (Trillat, 1896). Cette découverte fût brevetée par Whilhelm Krische et Adolph Spitteler pour la fabrication de tableaux blancs en 1897 avant d'être largement utilisée au début du XXème siècle dans la fabrication de boutons et de bijoux (Seymour *et al.*, 1989). Les techniques de réaction phénol-formaldéhyde ont ensuite fait l'objet d'améliorations et c'est en 1907 que Leo Hendrik Baekeland créa la première résine entièrement synthétique à connaître un succès

commercial nommée « Bakélite » (Bijker, 1987 ; Feldman, 2008). Fabriquée en série, la Bakélite s'imposa dans de nombreux secteurs tels que le bâtiment (*e.g.* prises, interrupteurs, gaines électriques), l'industrie automobile et aéronautique (*e.g.* volants, plaquettes de frein, pales d'hélices) ou encore la fabrication d'objets du quotidien (*e.g.* stylos, téléphones, ventilateurs, horloges, appareils photo, aspirateurs) (Bijker, 1987). Avec cette nouvelle matière bon marché, non-inflammable, résistante et légère, les fondations de l'industrie moderne du plastique venaient d'être établies. Vont suivre un certain nombre de découvertes telles que le cellophane (Jacques E. Brandenberger, 1908), le polychlorure de vinyle (PVC, découvert accidentellement en 1835 et 1872 mais développé par Waldo Semon en 1926), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA ou « Plexiglas » par Otto Röhm et Hass en 1933), le polyéthylène basse densité (LDPE, Eric Fawcett et Reginald Gibson, 1933), les polyamides (PA ou « nylon », Wallace Hume Carothers, 1935), les polyuréthanes (PUR, Otto Bayer, 1937) ou encore le polyétrafluoroéthylène (PTFE ou « Téflon », Roy Plunkett, 1938) (Feldman, 2008 ; Gilbert, 2017).

Par la suite, le développement de la chimie de synthèse va être dédié aux besoins militaires de la Seconde Guerre mondiale (*e.g.* silicone, caoutchouc synthétique). Ce n'est qu'au lendemain de cette dernière que cet élan scientifique et technologique insuflé à l'industrie va se pousuivre et s'intensifier (Gilbert, 2017). La consommation de masse, le besoin en matières premières et la diversification des secteurs d'activité vont entraîner une explosion de la demande favorisant l'essor d'une industrie nouvelle. La pétrochimie devient de plus en plus accessible et va permettre la production massive de plastiques à partir du pétrole ou du gaz naturel. Le choc pétrolier (1973) marque un tournant dans l'histoire de la consommation des produits de la pétrochimie, les matières plastiques deviennent de plus en plus sophistiquées et spécifiques. Les matières plastiques entrent dans l'ère industrielle et vont continuer de se développer et accompagner l'histoire contemporaine.

1.2. Fabrication et classification des polymères synthétiques

La notion de « polymères » fait référence aux matériaux composés de longues chaînes de molécules élémentaires, appellées « monomères », reliées par des liaisons covalentes. Ces macromolécules sont constituées d'atomes de carbone sur lesquelles d'autres éléments (*e.g.* chlore, hydrogène, azote, oxygène) pourront être fixés *via* des opérations chimiques (Gedde, 1999). Bien qu'il soit possible de fabriquer du plastique à partir de polymères biosourcés (*i.e.* naturels), le plastique moderne est aujourd'hui majoritairement produit à partir de polymères synthétiques issus d'énergies fossiles (Geyer *et al.*, 2017). En effet, près de 4 à 6% des ressources pétrolières sont consacrées à la plasturgie (PlasticsEurope, 2019). Après son extraction, le pétrole subit une étape de raffinage permettant de séparer ces divers constituants tels que le fuel (pour le chauffage), le gazole et le kérosène (pour le carburant) ou encore le

naphta, utilisé dans la fabrication du plastique. Une fois isolé, le naphta subit à son tour une étape primordiale de transformation qui consiste à réduire les molécules d'hydrocarbures en sous-unités par fragmentation. Des monomères (de 2 à 7 atomes de carbones) sont ainsi obtenus et enchaînés par réaction (polymérisation) pour former des polymères, la base des matières plastiques (Gedde, 1999). La nature de ces enchaînements permet de dissocier les macromolécules linéaires ou ramifiées (liaisons faibles) des macromolécules réticulées (liaisons fortes). Ainsi, les polymères sont classés en trois catégories : les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères (Aucher, 2009).

Les thermoplastiques sont des polymères composés de chaînes linéaires. Leur malléabilité après chauffage est leur principale caractéristique puiqu'elle facilite leur mise en forme avant qu'ils ne retrouvent leur rigidité initiale après refroidissement. Cette réversibilité ne dégrade en rien leur structure moléculaire les rendant souvent aptent au recyclage (Grigore, 2017). Cette vaste famille de polymères représente aujourd'hui près de 90% des matières plastiques produites avec notamment les polyoléfines (*e.g.* polyéthylène [PE], polypropylène [PP]), les polyvinyliques (*e.g.* PVC), les polystyrèniques (*e.g.* polystyrène [PS]), ou encore les polyesters linéaires (*e.g.* polyéthylène téréphtalate [PET]). Contrairement aux thermoplastiques, les thermodurcissables sont des polymères infusibles et non-transformables ce qui empêche leur recyclage. Ils sont composés de chaînes réticulées dont la forme est irréversible conduisant généralement à un produit solide et rigide. Cette catégorie de polymère est principalement représentée par le polyuréthane (PU), les polyesters insaturés (e.g résines orthophtaliques et isophtaliques) et les résines époxy. Les élastomères quant à eux sont des polymères faiblement réticulés qui présentent des propriétés « élastiques ». Ils peuvent supporter de très grandes déformations avant rupture ou retrouver leur forme initiale après étirement. Le caoutchouc et le néoprène en sont les principaux représentants (Feldman, 2008).

1.3. Du polymère à la matière plastique

Une fois synthétisés, les polymères (résine brute) sont enrichis par l'incorporation d'adjuvants afin d'adapter le produit final à sa future utilisation (plastique formulé). Par exemple, la résitance et la qualité du plastique peuvent être améliorées en incorporant des charges minérales (*e.g.* verre), métalliques (*e.g.* aluminium), ou organiques (*e.g.* bois). Certains additifs comme les plastifiants (*e.g.* phtalates, bisphénol A, naphtalène), les stabilisants (*e.g.* nonylphénol), les ignifugeants (*e.g.* polybromodiphényléther [PBDE]), les tensioactifs (*e.g.* alkylphénols) ou encore les lubrifiants (*e.g.* cire, paraffine) et les colorants sont également utilisés pour améliorer certaines propriétés des matières plastiques (Bittner *et al.*, 2014 ; Bolgar *et al.*, 2015). Ces formulations diffèrent d'un industriel à l'autre et sont le plus souvent tenues secrètes (Bolgar *et*

al., 2015). Par ailleurs, ces polymères enrichis sont, dans la plupart des cas, conservés sous forme de poudres ou de granulés de résine, prêts à être transformés.

La transformation de la résine plastique en produit fini ou semi-fini repose sur des méthodes de mise en œuvre dépendantes des polymères. Pour les thermoplastiques, de nombreux procédés de mise en œuvre peuvent être employés (*e.g.* le moulage par injection ou par expansion, l'extrusion, le rotomoulage, le thermoformage, etc.). En revanche, pour les thermodurcissables, les méthodes employées sont plus limitées et reposent principalement sur le moulage par compression, par coulée ou par injection. Dans tous les cas, l'ensemble de ces mises en œuvre peuvent se résumer en trois étapes : la fusion, la mise en forme et la solidification (Trotignon *et al.*, 2006). Une fois transformées, les matières plastiques vont être commercialisées et utilisées dans de nombreux domaines d'applications.

1.4. Domaines d'application et croissance de l'industrie plastique

Grâce à leur immense potentiel et leurs innombrables propriétés d'usage, les matières plastiques se sont imposées dans tous les secteurs d'activité (*e.g.* agroalimentaire, bâtiment, automobile, électricité-électronique, santé-médecine). Leurs caractéristiques avantageuses reposent principalement sur une grande résistance mécanique, thermique et chimique qui leur confère une longue durée de vie. Elles sont également imperméables, légères, élastiques, colorables, rigides ou souples, et représentent un faible coût de production (Trotignon *et al.*, 2006). Dotées de telles propriétés, l'importance économique des matières plastiques est rapidement devenue prépondérante dans le secteur industriel. La production mondiale de plastique est passée de 1,5 million de tonnes (Mt) en 1950 à près de 360 Mt en 2018 (PlasticsEurope, 2019) (**Figure 1**A). Cette production augmente chaque année (~ 9%/an) et se répartie notamment entre la Chine (30%), le reste de l'Asie (21%), l'Amérique du Nord (18%) et l'Europe (17%) (PlasticsEurope, 2019). Cependant, il est à noter que cette production mondiale publiée dans les rapports annuels de PlasticsEurope est sous-estimée puisqu'elle ne comptabilise pas la production de certaines fibres (PET, PA et polyacryliques). Pourtant, près de 70 Mt de fibres synthétiques ont été produites dans le monde en 2018, dont 70-80% de fibres PET (Statista, 2019). Nonobstant ce constat, l'utilisation de matières plastiques est dominée par certains polymères synthétiques qualifiés de polymères de grande diffusion. En effet, les activités industrielles et domestiques sont marquées par l'utilisation du PE, PP, PS, PVC, PET et du PUR. Ces six polymères font partie d'un groupe communément qualifié de « Big Six » puisqu'ils représentent, à eux seuls, près de 80% de la demande totale de matières plastiques (PlasticsEurope, 2019). Si la demande du secteur du textile occupe une place importante dans l'industrie chinoise (~ 70% de la production mondiale de fibres synthétiques ; Lin et Zhao, 2015), la demande du marché européen se répartit principalement entre les secteurs de l'emballage

(40%), du bâtiment (20%) et de l'automobile (10%) (**Figure 1**B). En Europe, la plasturgie représente 360 milliards d'euros de chiffre d'affaire répartis entre 60 000 entreprises pour 1,6 million d'emplois (PlasticsEurope, 2019).

Par ailleurs, la consommation de matières plastiques est très inégale entre les pays du monde. Alors que la consommation de plastique dans certains pays d'Afrique (*e.g.* Ethiopie, Kenya) ne représente que 2 à 8 kg/habitant/an, celle de certains pays d'Europe (*e.g.* Belgique, République Tchèque pour les plus importants consommateurs) et d'Asie (*e.g.* Corée, Taïwan) s'élève entre 115 et 150 kg/habitant/an (EUROMAP, 2015). Cette forte consommation a fait l'objet de plusieurs études comportementales démontrant notamment la présence de produits à usages uniques tels que les sacs et les bouteilles en plastique (Jakovcevic *et al.*, 2014 ; Martinho *et al.*, 2017 ; Orset *et al.*, 2017) ou encore les emballages alimentaires (Wikström *et al.*, 2016).

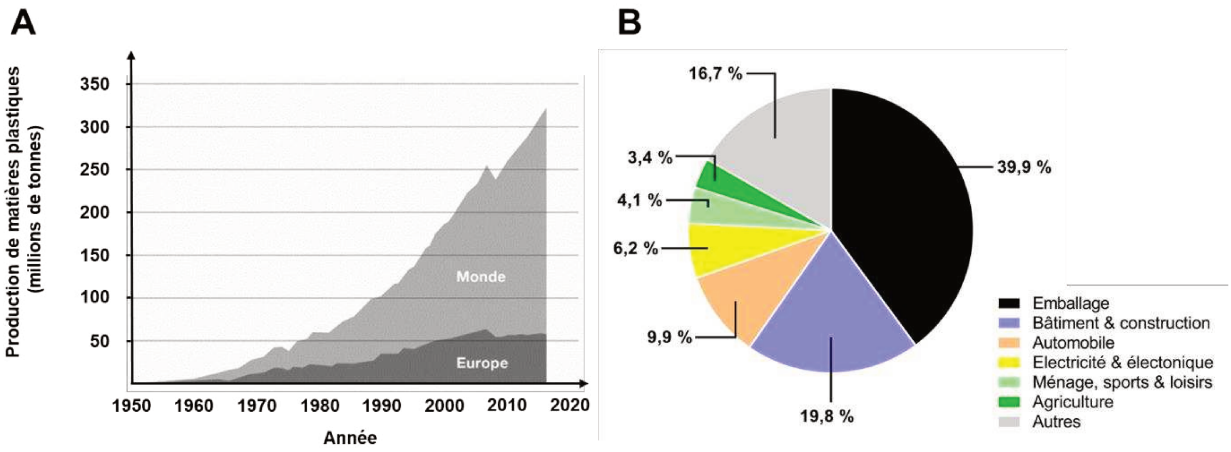


Figure 1. Évolution de la production de plastique mondiale (gris clair) et européenne (gris foncé) entre 1950 et 2016 (**A**). Répartition de la demande de plastique par secteur d'activité au sein de l'Union Européenne (**B**). *Modifiés d'après PlasticsEurope (2019).*

1.5. Gestion des déchets plastiques

Globalement, l'utilisation de matières plastiques à usage unique (*e.g.* emballages, sacs et couverts jetables, pailles) représente environ 50% des déchets plastiques (Hopewell *et al.*, 2009). D'après Geyer *et al.* (2017), environ 8,3 milliards de tonnes de plastique ont été produites entre 1950 et 2015 et seulement 30% sont toujours exploitées. Cela signifie qu'en 65 ans, l'Homme a généré plus de 6 milliards de tonnes de déchets plastiques (Geyer *et al.*, 2017). Ces déchets en fin de vie ont longtemps été réduits à s'amonceler dans les décharges et/ou à être rejetés dans l'environnement. Depuis 1980, les opérations de valorisation sont en constante

augmentation (Geyer *et al.*, 2017) (**Figure 2**). À ce jour, les deux méthodes principalement employées pour valoriser les déchets plastiques sont (1) la valorisation de la matière (*i.e.* le recyclage) ou (2) la valorisation énergétique (*i.e.* l'incinération). Le recyclage repose sur la transformation de la matière première en matière secondaire pour la conception de nouveaux produits. L'incinération, quant à elle, consiste à produire de l'énergie (*i.e.* électricité, chauffage) par combustion (Al-Salem *et al.*, 2010). Néanmoins, ces débouchés restent toujours insuffisants puisque 55% des déchets plastiques produits en 2015 ont été rejetés dans l'environnement (Geyer *et al.*, 2017).

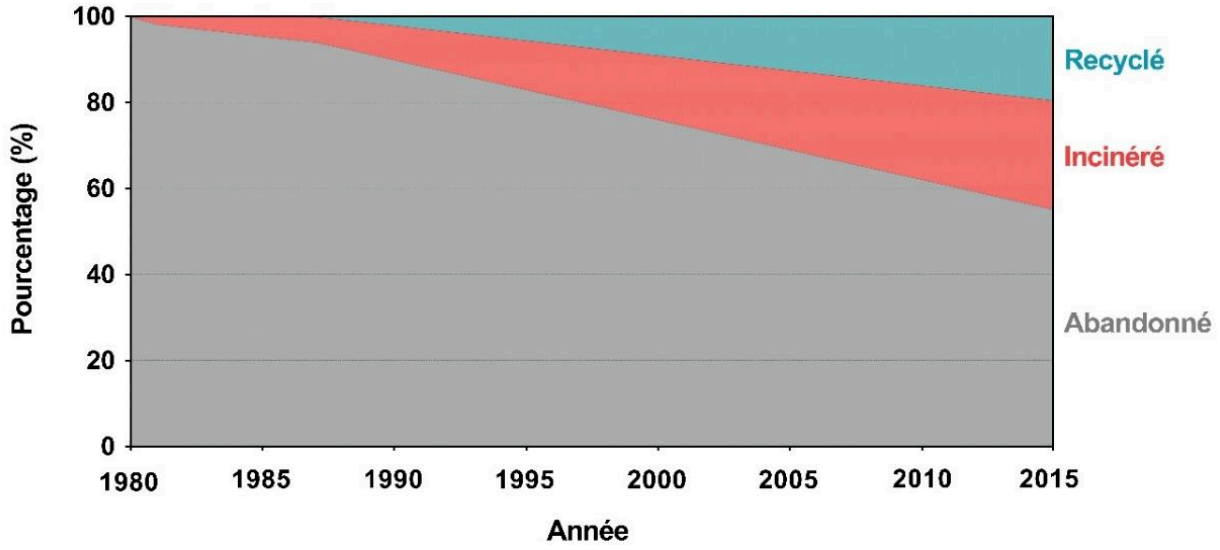


Figure 2. Gestion des déchets plastiques entre 1980 et 2015. Parts estimées des déchets plastiques mondiaux par méthode de traitement. *D'après Geyer et al. (2017) et modifié par Ritchie et Roser (2018) – Our World in Data.*

Pour être en mesure de suivre le rythme de la production plastique actuelle, les procédés de gestion des déchets doivent impérativement faire l'objet d'améliorations et d'innovations. Cependant, ces chaînes de production-consommation-élimination restent complexes et multinationales puisqu'une grande partie des déchets plastiques mondiaux sont exportés dans les pays d'Asie et d'Afrique (Hopewell *et al.*, 2009 ; Brooks *et al.*, 2018). Or, un certain nombre d'entre eux ne disposent pas de systèmes efficaces pour la gestion des déchets (**Figure 3**) (Oyake-Ombis *et al.*, 2015 ; Serrona *et al.*, 2010). Cette situation explique que la majorité de la pollution plastique marine est issue de ces régions (voir section 2.1) (Jambeck *et al.*, 2015). Par conséquent, la Chine et l'Indonésie ne souhaitent plus endosser le rôle de « poubelle du monde » ce qui les amènent, depuis 2018, à renvoyer les déchets plastiques illégalement importés aux pays exportateurs (Gregson and Crang, 2019). D'après Lebreton et Andrady (2019), la quantité

de déchets plastiques relarguée dans l'environnement devrait atteindre environ 213 Mt à partir de 2060 si aucune amélioration n'est apportée à la gestion actuelle des déchets.

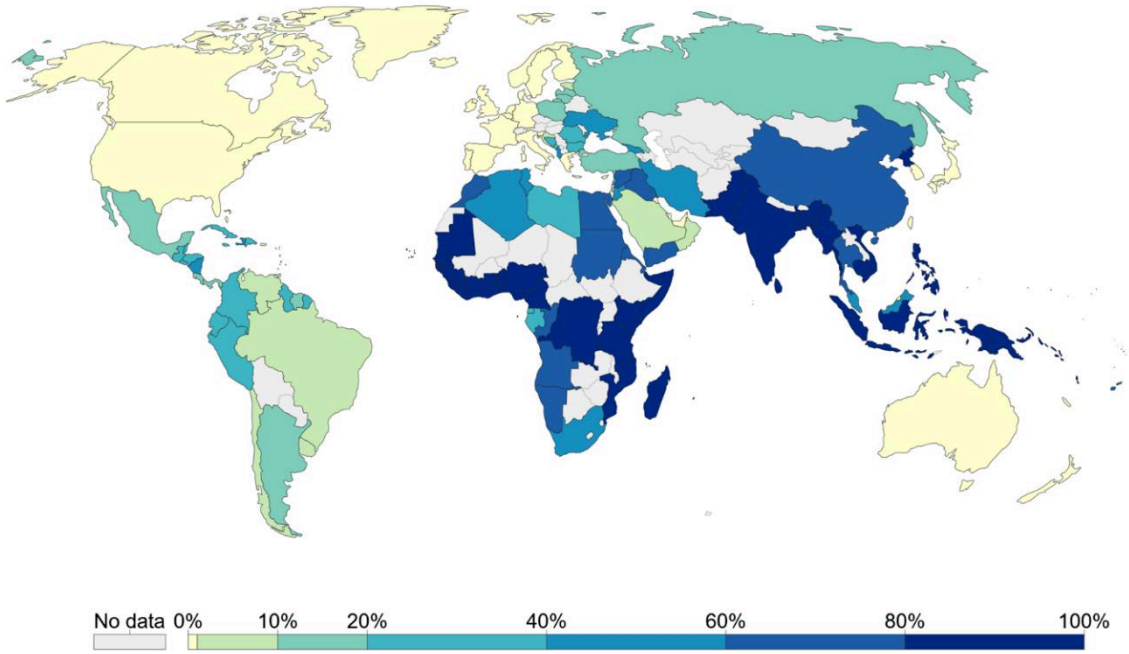


Figure 3. Proportion des déchets plastiques non-gérés et gérés de manière inadéquate selon les pays du monde (données 2010). *D'après Jambeck et al., 2015 et analysé par Ritchie and Roser (2018) – Our World in Data.*

1.6. Pollution plastique de l'environnement et solutions alternatives

Émergeant comme l'un des grands défis de notre temps, la pollution de l'environnement par les matières plastiques a largement gagné l'attention des publics. La quantité totale de déchets plastiques accumulée dans le milieu naturel depuis 1950 s'élèverait à 4,9 milliards de tonnes (Geyer *et al.*, 2017). Cette accumulation est telle qu'une époque géologique a été octroyée à l'époque actuelle : l'Anthropocène (Waters *et al.*, 2016). Paradoxalement, la résistance conférée aux matières plastiques pour leur usage, les rendent persistantes dans l'environnement ce qui suscite de grandes préoccupations écologiques (Moore, 2008 ; Worm *et al.*, 2017). En effet, la dégradation biologique naturelle (biodégradation) des polymères synthétiques est un processus extrêmement lent, pouvant prendre plusieurs centaines d'années (Barnes *et al.*, 2009). Une étude récente et prometteuse a néanmoins démontré la faculté d'une enzyme à dégrader rapidement le PET (*i.e.* polymère utilisé dans la conception des bouteilles en plastique) et le rendre recyclabe (Tournier *et al.*, 2020). Le développement de plastique biodégradable (*i.e.* fait à partir de lignine, cellulose, amidon ou bioéthanol) est également une solution alternative de

grand intérêt. À l'heure actuelle, les polymères naturels biodégradables et disponibles sur le marché comprennent principalement l'acide polylactique (PLA), le polyhydroxyalcanoate (PHA), le polyhydroxybutyrate (PHB), le polyhydroxybutyrate valérate (PHBV) et le polyhydroxybutyrate (PHV). Ces « bioplastiques » peuvent se biodégrader et n'entraîneraient aucun effet nocif causé par leur persistance d'après Haider *et al.* (2019). Toutefois, leur innocuité n'a pas été entièrement prouvée (Haider *et al.*, 2019), il est donc encore trop tôt pour suggérer un amoindrissement de la pollution environnementale grâce à leur utilisation. Selon un rapport paru à l'occasion de l'Assemblée des Nations Unies pour l'Environnement, le préjudice financier global de la pollution de l'environnement marin par les déchets plastiques est estimé à plus de 13 milliards de dollars par an (UNEP, 2014). Il est vrai qu'une fois abandonnés, les déchets plastiques peuvent intéragir avec la biodiversité terrestre (Rillig *et al.*, 2017 ; de Souza Machado *et al.*, 2018) mais sont surtout sujets aux transports *via* les voies navigables (*e.g.* rivières, fleuves), les vents et les marées (Jambeck *et al.*, 2015). Or, ces moyens de transport convergent tous vers l'océan considéré ainsi comme le réceptacle final des déchets plastiques (Barnes *et al.*, 2009 ; Thompson *et al.*, 2009 ; Jambeck *et al.*, 2015).

2. Les océans comme destination finale des déchets plastiques

2.1. Origine des déchets plastiques

Les matières plastiques représentent 70% des déchets anthropiques rejetés dans l'environnement marin (Derraik, 2002). En 2010, il a été estimé qu'entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de déchets plastiques ont fini leur course dans les océans (Jambeck *et al.*, 2015). Cette quantité est dépendante des activités terrestres (*e.g.* activités industrielles, tourisme, agriculture) en lien avec le statut économique et la démographie des pays côtiers (Jambeck *et al.*, 2015). Selon la littérature, les intrants d'origine terrestre représentent entre 70 et 80% des déchets plastiques océaniques (W. C. Li *et al.*, 2016 ; Lebreton *et al.*, 2018). L'Asie représente la principale source de déchets répartie notamment entre la Chine (28%), l'Indonésie (10%), les Philippines et le Vietnam (6%) (Jambeck *et al.*, 2015) (**Figure 4**). Ce transfert océanique est principalement sous l'influence des variations saisonières des fleuves et des rivières dont la contribution s'avère importante (*i.e.* entre 0,4 et 4 Mt de déchets plastiques/an) (Lebreton *et al.*, 2017 ; Schmidt *et al.*, 2017) (**Figure 4**). Concernant les apports d'origine océanique (20-30%), la pêche commerciale représente la source majeure puisqu'elle correspond à une part d'intrants comprise entre 10 et 18% (*e.g.* lignes, cordes et filets de pêche). S'ensuivent le commerce

maritime (*e.g.* perte de marchandises pendant les imports/exports) et l'aquaculture (*e.g.* bouées, cordes) (Lebreton *et al.*, 2018).

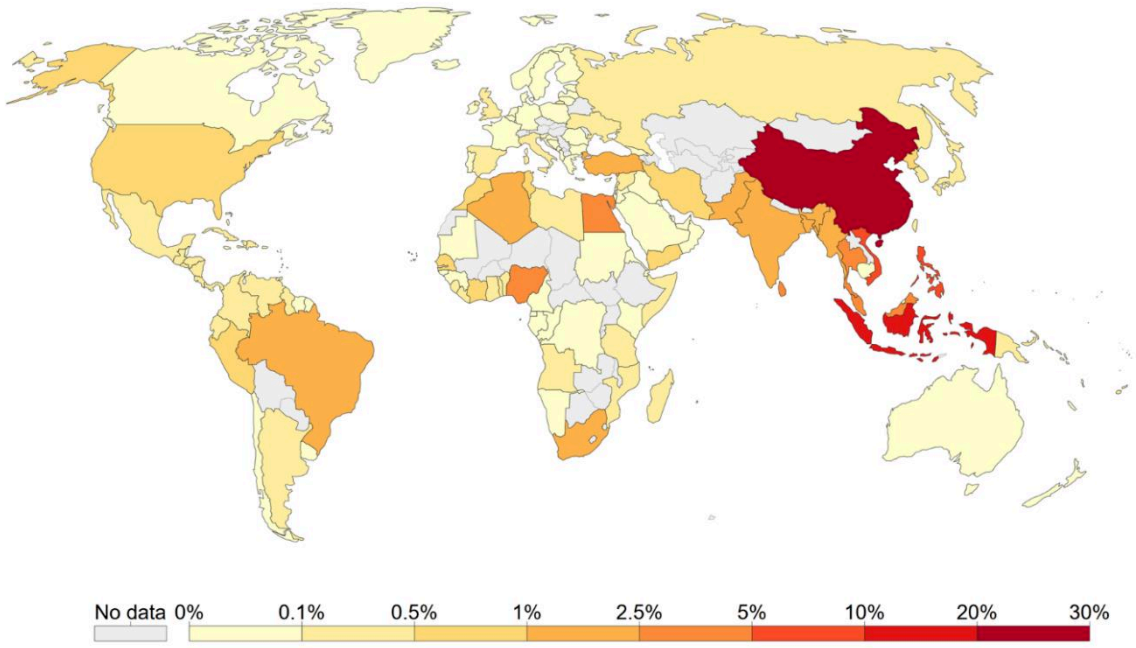


Figure 4. Répartition globale des déchets plastiques non-gérés et gérés de manière inadéquate (données 2010). *D'après Jambeck et al. (2015) et analysé par Ritchie et Roser (2018) – Our Worl in Data.*

2.2. Distribution spatiale et accumulation

De part leurs caractéristiques intrinsèques et l'influence des facteurs environnementaux, les déchets plastiques sont disséminés aux quatre coins du globe terrestre, des régions fortement anthropisées (Lebreton *et al.*, 2012) aux plus insulaires (Cózar *et al.*, 2017), en passant par les plages, les côtes et le fond des océans (Galgani *et al.*, 2015). Cette répartition en mer dépend principalement de la densité des polymères plastiques (**Tableau 1**). Les plastiques dont la densité est inférieure à l'eau de mer (~ 1 $g.cm^{-3}$) ont une bonne flottabilité (*e.g.* PE, PP) et peuvent être transportés sur de longues distances (Andrady, 2011). Cette migration est en grande partie liée à l'influence des courants océaniques qui convergent vers des zones tourbillonnaires appelées « gyres océaniques » (Cózar *et al.*, 2014) (**Figure 5**). Grâce à des bouées dérivantes déployées au nord-est de l'océan Pacifique, des modèles de circulation ont révélé une migration de la côte est des États-Unis au gyre océanique de l'Atlantique Nord en moins de 60 jours (Law *et al.*, 2010). Ainsi, bien qu'une quantité non-négligeable de déchets reste ou s'échoue sur les bandes côtières (ExpéditionMED, 2016), une grande partie des déchets flottants migrent vers

les gyres et s'y accumulent (Cózar *et al.*, 2014) ; le gyre de l'océan Pacifique Nord étant la zone d'accumulation la plus importante, également connue (à défaut) sous le nom de « 7ème continent » (**Figure 5**). En plus des courants, les déchets flottants peuvent être transportés par le vent, les marées et autres phénomènes climatiques (*e.g.* inondation, tsunami) (Ryan *et al.*, 2009 ; Desforges *et al.*, 2014 ; Sadri et Thompson, 2014). Par ailleurs, bien que les gyres soient symboliques de la pollution plastique, on estime qu'environ 50% des déchets plastiques en mer se trouvent sur le fond des océans (Galgani *et al.*, 2015). En effet, les plastiques dont la densité est supérieure à l'eau de mer (*e.g.* PET, PVC) se retrouvent essentiellement au fond des océans ou bien dans la colonne d'eau où ils peuvent également être transportés par des courants sous-marins (Engler, 2012). Cette densité des débris flottants peut notamment augmenter durant leur temps de résidence en mer *via* l'infiltration d'eau, l'hydrolyse et l'encrassement biologique (« biofouling »). En effet, suite au biofouling, les débris plastiques atteignent progressivement la densité de l'eau de mer et entrent dans la colonne d'eau pour ensuite y dériver et couler lentement au fond des océans (Lobelle et Cunliffe, 2011). Comme l'ont rapporté Lobelle et Cunliffe (2011), plus les biofilms microbiens se développent tôt sur les débris, plus vite le plastique perd en hydrophobicité et en flottabilité, ce qui accélère la descente des débris sous la surface des eaux. La mise en place d'un biofilm, l'adhésion du phytoplancton, l'agrégation de débris organiques et inorganiques ainsi que la colonisation par tous types d'organismes (*e.g.* larves d'invertébrés) sont autant de mécanismes (*i.e.* biofouling) qui entraînent une sédimentation accrue des débris (Avio *et al.*, 2017). Cependant, des expériences ont montré que les débris plastiques encrassés par le biofouling peuvent subir un « defouling » rapide lorsqu'ils atteignent une trop grande profondeur et/ou par « grazing » (*e.g.* broutage par le zooplancton), ce qui provoque leur remontée en surface (Andrady, 2011). Cette dynamique cyclique rend les débris plastiques disponibles pour les organismes présents à différentes profondeurs dans la colonne d'eau et à des moments différents. Dans le cas contraire, les débris encrassés peuvent continuer de couler pour finalement atteindre le benthos (Wright *et al.*, 2013b).

Tableau 1. Densité des principaux polymères retrouvés dans les océans. *D'après Duis et Coors (2016) – Environmental Sciences Europe*

Polymère	Abréviation	Densité (g cm^{-3})
Polystyrène expansé	EPS	0,01 - 0,04
Polypropylène	PP	0,83 - 0,92
Polyéthylène à faible densité	LDPE	0,89 - 0,93
Polyéthylène à haute densité	HDPE	0,94 - 0,98
Polystyrène	PS	1,04 - 1,10
Polyamide	PA	1,02 - 1,16
Polyuréthane	PUR	1,20
Polycarbonate	PC	1,20 - 1,22
Polyéthylène téréphtalate	PET	0,96 - 1,45
Polychlorure de vinyle	PVC	1,16 - 1,58
Polyester	PES	1,24 - 2,30
Polytétrafluoroéthylène	PTFE	2,10 - 2,30

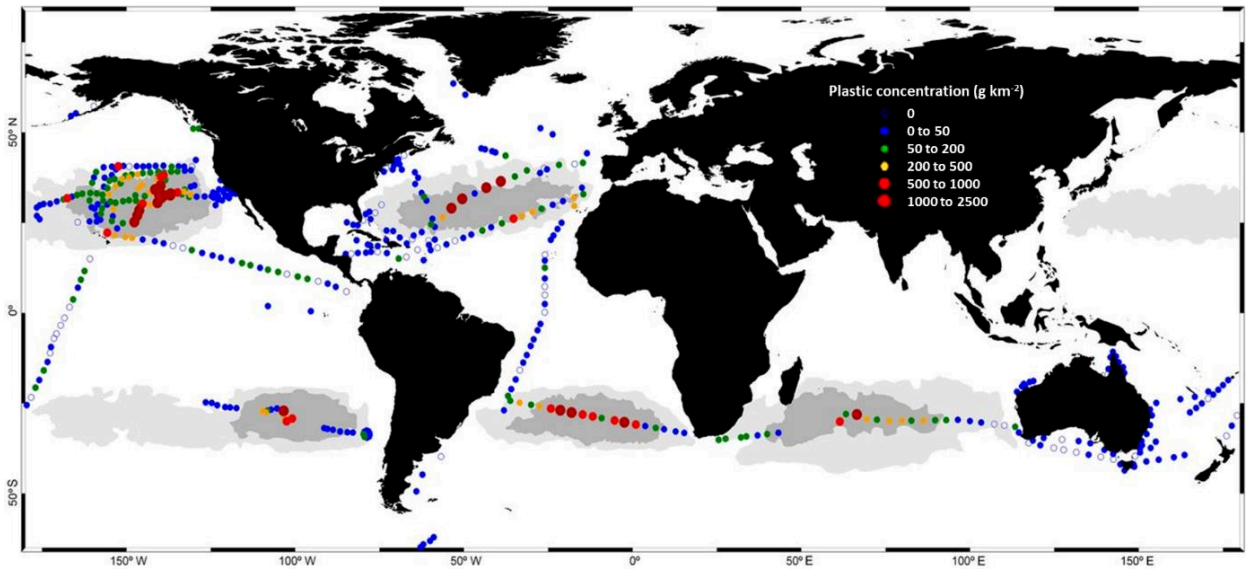


Figure 5. Concentrations des débris plastiques à la surface des océans. La carte illustre les concentrations moyennes recensées dans 442 sites représentant 1127 traits de filets en surface. Les zones grises indiquent des zones d'accumulation (gyres océaniques) prédites par un modèle de circulation globale de Maximenko *et al.* (2012). Les zones en gris foncé et gris clair représentent respectivement des zones d'accumulation plus ou moins importantes ; les zones blanches sont potentiellement des zones où les débris plastiques ne s'accumulent pas. *D'après Cózar et al. (2014) – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS).*

2.3. Fragmentation, formation et classification des débris plastiques

Si le devenir des déchets plastiques a longtemps fait l'objet d'interrogations, la notion de « fragmentation » des déchets est progressivement devenue le centre des débats (Thompson, 2004 ; Barnes *et al.*, 2009). En effet, malgré la durabilité des polymères synthétiques, les déchets plastiques marins sont exposés à différents processus biotiques et abiotiques qui fragilisent leur intégrité. Ces processus se traduisent par un vieillissement de la matière plastique (*e.g.* décoloration, diminution du poids moléculaire, modification des propriétés de surface) qui va s'éroder et se fragmenter en débris de toutes tailles (Andrady, 2011).

Les principales causes de cette dégradation sont la photodégradation induite par les rayonnements ultraviolets (UV) et les processus d'oxydation qui interviennent en mer (Andrady, 2011, 2015 ; Gewert *et al.*, 2015). Une fois la matrice polymère fragilisée, d'autres facteurs tels que l'abrasion du vent et des vagues, ou encore l'action de l'eau (*i.e.* hydrolyse) ou des (micro-)organismes (*i.e.* biodégradation) vont entrer en jeu et induire sa fragmentation. Cette cinétique de dégradation-fragmentation est naturellement dépendante des conditions environnementales. Ainsi, un déchet plastique échoué sur une plage sera bien plus exposé aux rayonnements UV, à l'abrasion du sable, des vagues et du vent qu'un déchet présent au fond des océans où la

dégradation peut être très ralentie (Andrady, 2011 ; Ioakeimidis *et al.*, 2014). De plus, un biofilm et/ou biofouling peut se développer sur les déchets plastiques selon la strate aquatique où ils se situent. Cela peut le protéger directement ou indirectement, en les faisant couler, de la photodégradation (Ye et Andrady, 1991 ; Weinstein *et al.*, 2016). La vitesse de dégradation dépend également de la taille/forme des débris, des propriétés de la matrice polymère mais aussi des additifs incorporés dans sa formulation (*e.g.* antioxydants, stabilisateurs) (Gewert *et al.*, 2015 ; Ter Halle *et al.*, 2016). Les plus petits fragments de plastiques, souvent invisibles à l'œil nu, peuvent subir une dégradation supplémentaire (généralement microbienne) par la conversion de l'élément carbone contenu dans le polymère en carbone libre. De plus, la composition et la complexité de la structure polymérique influent sur la capacité des microorganismes à se fixer sur la surface des fragments, ce qui détermine la biodégradabilité des plastiques. Lorsque la biodégradation s'achève et que tout le carbone organique présent dans le polymère est converti, on parle de « minéralisation complète » (Andrady, 2011).

Cette formation de débris plastiques est à la fois exacerbée par l'accumulation massive de déchets qui augmente depuis plus d'un demi-siècle, mais aussi par leur vieillissement constant. Même si la pollution de l'environnement marin par les matières plastiques venait à cesser immédiatement, le gisement actuel continuerait de représenter une source importante de débris plastiques (Thompson, 2015). En effet, une étude suggère que les débris plastiques présents dans les océans aujourd'hui sont essentiellement issus de la fragmentation de déchets plastiques rejetés dans l'environnement marin dans les années 90 et les décennies précédentes (Lebreton *et al.*, 2019). Ainsi, il existe différentes tailles de débris. Ils ont été classifiés dans l'objectif d'évaluer leurs impacts sur l'écosystème marin et d'être en mesure d'interpréter et comparer les résultats scientifiques. Bien que cette classification fasse toujours l'objet de débats ou controverses (Hartmann *et al.*, 2019) (**Figure 6**), les débris plastiques sont globalement divisés en cinq catégories : les mega- (> 100 mm), macro- (> 20 mm), meso- (5-20 mm), micro- (< 5 mm) et nanoplastiques (< 1 µm) (Barnes *et al.*, 2009 ; GESAMP, 2015).

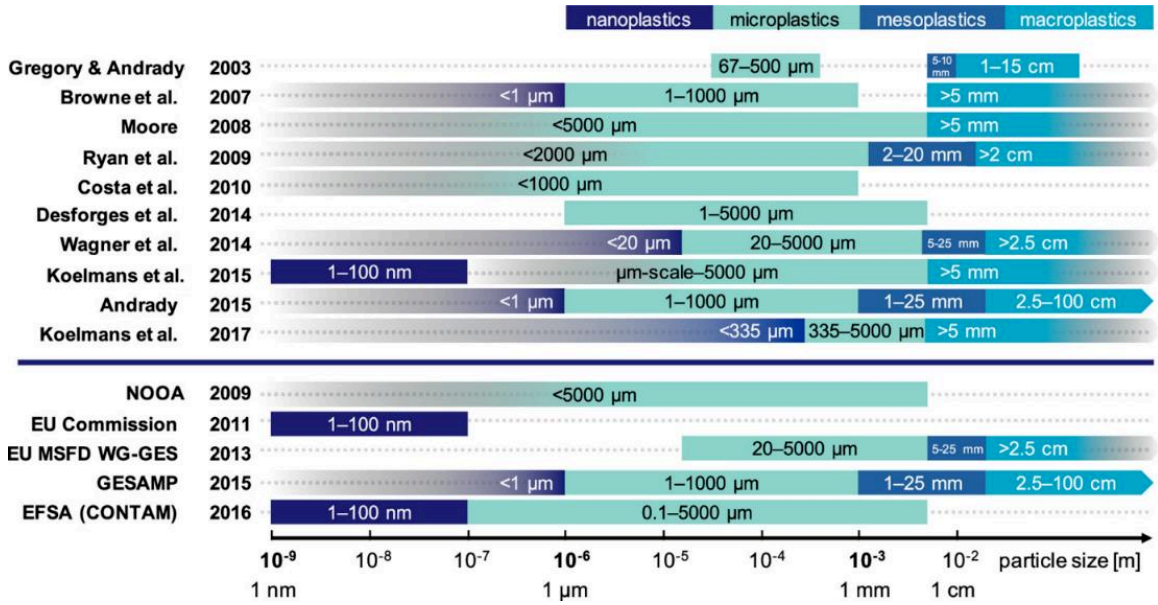


Figure 6. Classifications proposées dans la littérature et les rapports institutionnels afin de définir les différentes catégories de débris plastiques en fonction de leur taille. *D'après Hartmann et al. (2019) – Environmental Science & Technology.*

3. Impacts écologiques des débris plastiques

Dans le milieu naturel, l'omniprésence des débris plastiques et leur disparité de taille, forme, aspérité et composition (*e.g.* types de polymère, additifs), réprésentent une grande menace pour la biodiversité. De nombreuses études *in situ* ont porté sur les incidences écologiques que pouvaient occasioner ces débris. Pour la plupart, il s'agit d'effets observés sur le terrain qui impliquent principalement des macroplastiques et leurs incidences sur de nombreuses espèces marines telles que les oiseaux, les tortues, les mammiphères et les cétacés (Laist, 1997 ; Derraik, 2002 ; Gall et Thompson, 2015 ; Kühn *et al.*, 2015 ; Nelms *et al.*, 2016). D'après Gall et Thompson (2015), 17% des espèces affectées par les débris plastiques sont classées sur liste rouge comme « menacées » ou « en danger d'extinction » par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN). À ce jour, il existe deux voies principales par lesquelles les débris plastiques peuvent affecter la faune au travers d'interactions : l'enchevêtrement et l'ingestion (Law, 2017).

3.1. Enchevêtrement

L'enchevêtrement regroupe l'ensemble des phénomènes de piégeage, d'encerclement ou d'étranglement qui affectent à ce jour au moins 344 espèces recensées (Kühn *et al.*, 2015) (**Figure 7**). Dans la plupart des cas, ces phénomènes impliquent des lignes, des filets et autres

équipements de pêche abandonnés ou perdus, communément appelés « pêche fantome » (Gall et Thompson, 2015 ; Kühn *et al.*, 2015). Selon les estimations de Gilardi *et al.* (2010), un filet de pêche abandonné dans le Puget Sound (État-Unis) capture en moyenne deux invertébrés par jour, un poisson tous les trois jours et un oiseau marin tous les cinq jours. L'enchevêtrement peut induire diverses lésions corporelles (*e.g.* tissus cutanés, membres), interférer avec la croissance en provoquant des malformations et limiter les organismes dans leurs mouvements affectant ainsi leur nage, leur respiration, leur alimentation et les rendant vulnérable à la prédation (Law, 2017). Ce phénomène réduit considérablement l'espérance de vie des organismes (Laist, 1997).

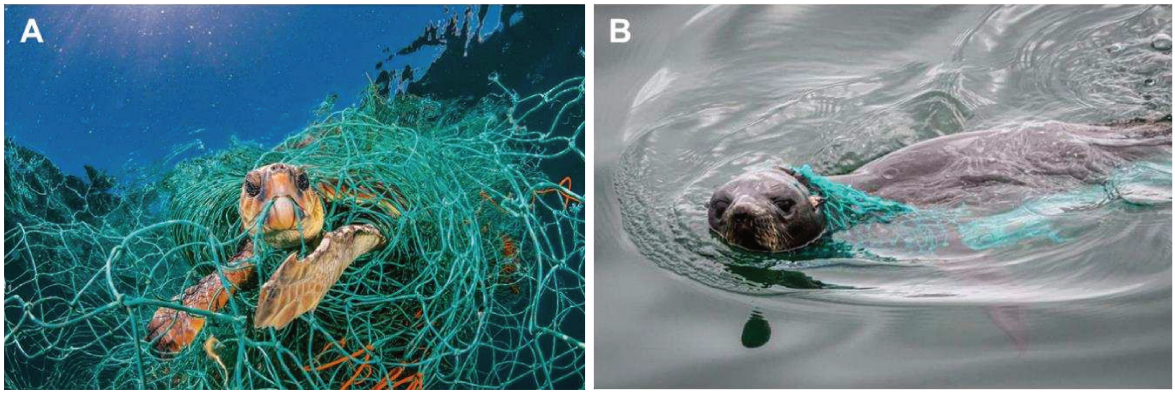


Figure 7. Exemples d'enchevêtrement observés chez une tortue marine (**A**) et un phoque (**B**) emmêlés dans un filet de pêche abandonné. *Crédits : Jordi Chias (A) ; Douglas Croft/Ocean Conservancy (B).*

3.2. Ingestion

3.2.1. Ingestion directe et/ou indirecte

L'ingestion de plastique concerne plus de 331 espèces réparties sur différents niveaux trophiques (Kühn *et al.*, 2015) (**Figure 8**). Ce phénomène se produit de manière intentionnelle, accidentelle ou indirecte (*i.e.* transfert trophique) et la taille des débris ingérés est limitée par la taille de l'organisme et/ou par son mode d'alimentation (Kühn *et al.*, 2015). Par exemple, des microplastiques (*e.g.* fibres et particules plastiques) ont été détectés dans les tissus d'organismes filtreurs (*e.g.* huîtres et moules ; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014) et suspensivores (*e.g.* balanes ; Goldstein et Goodwin, 2013). Des macroplastiques (*e.g.* paquet de cigarettes, emballage alimentaire) ont quant à eux déjà été retrouvés dans l'estomac de certains poissons pélagiques (Jackson *et al.*, 2000), voire même des megaplastiques (*e.g.* 9 mètres de corde, 4,5 m de tuyau, deux pots de fleurs) dans l'estomac d'un cachalot échoué (de Stephanis *et al.*, 2013).

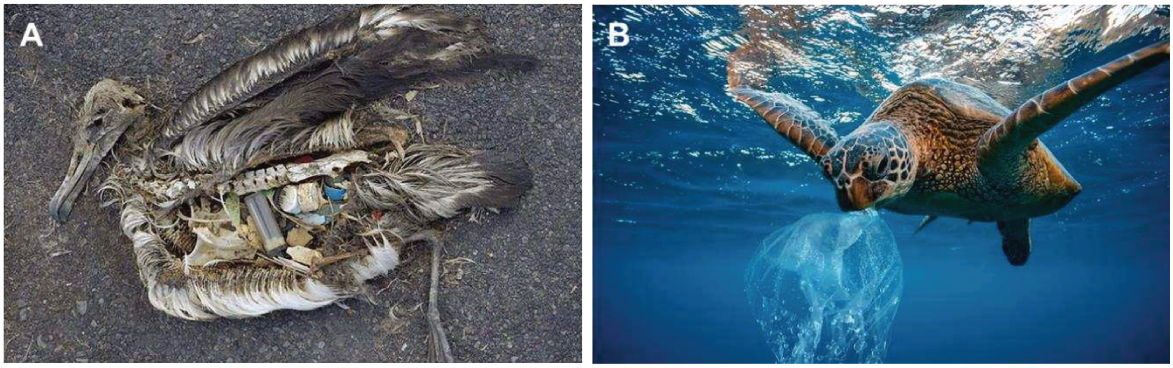


Figure 8. Phénomènes d'ingestion de matières plastiques observés (**A**) chez un oiseau marin retrouvé mort l'estomac rempli de débris divers et (**B**) chez une tortue marine tentant d'avaler un sac en plastique. *Crédits : Chris Jordan (A) ; Pacific Whale Foundation (B).*

L'ingestion intentionnelle de plastique est souvent liée à des stimulis visuels ou olfactifs qui amènent certains organismes à confondre le plastique avec leur nourriture habituelle. Par exemple, les tortues marines semblent confondre les sacs plastiques avec les méduses (Schuyler *et al.*, 2014). Aussi, certains oiseaux marins comme les albatros ont un odorat très développé et semblent être attirés par les sécrétions chimiques émises par leurs proies planctoniques qui sont adsorbés par les plastiques flottants (Savoca *et al.*, 2016). Néanmoins, l'ingestion de débris plastiques est le plus souvent accidentelle, c'est le cas par exemple des organismes filtreurs comme les bivalves (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014), les holothuries (Mohsen *et al.*, 2019) ou encore les baleines (Laist, 1997). Ces organismes se nourrissent en filtrant des volumes d'eau/sédiment qui peuvent contenir des débris plastiques en plus de la nourriture ciblée. Enfin, l'ingestion indirecte se traduit par un transfert trophique faisant intervenir une proie porteuse de plastique et son prédateur. En effet, certaines études expérimentales on démontré que les débris de petites tailles comme les micro- et nanoplastiques peuvent être ingérés par une grande variété d'organismes planctoniques tels que les copépodes, les euphausiacés (krill) et les larves de mollusques, décapodes et échinodermes (*e.g.* Cole *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2013). Ces animaux sont particulièrement susceptibles d'ingérer ces débris car bon nombre d'entre eux se nourrissent sans sélectivité et sont donc sujet à l'ingestion accidentelle (Moore, 2008). Ainsi, en plus d'être ingérés directement, les plus petits débris peuvent être ingérés indirectement à travers le réseau trophique et distribués le long de la chaine alimentaire (**Figure 9**) (Farrell et Nelson, 2013). Ce phénomène a été mis en évidence en alimentant des langoustines (*Nephrops sp.*) avec des petits poissons préalablement nourris avec des fibres de plastique. Les résultats ont révélé la présence de ces fibres dans 100% des intestins de *Nephrops sp.* (Murray et Cowie, 2011). D'autres études plus récentes ont montré que des microplastiques peuvent être transférés de la moule (*Mytilus edulis*) au crabe (*Carcinus maenas*) (Farrell et Nelson, 2013) et du zooplancton aux mysis (Setälä *et al.*, 2014).

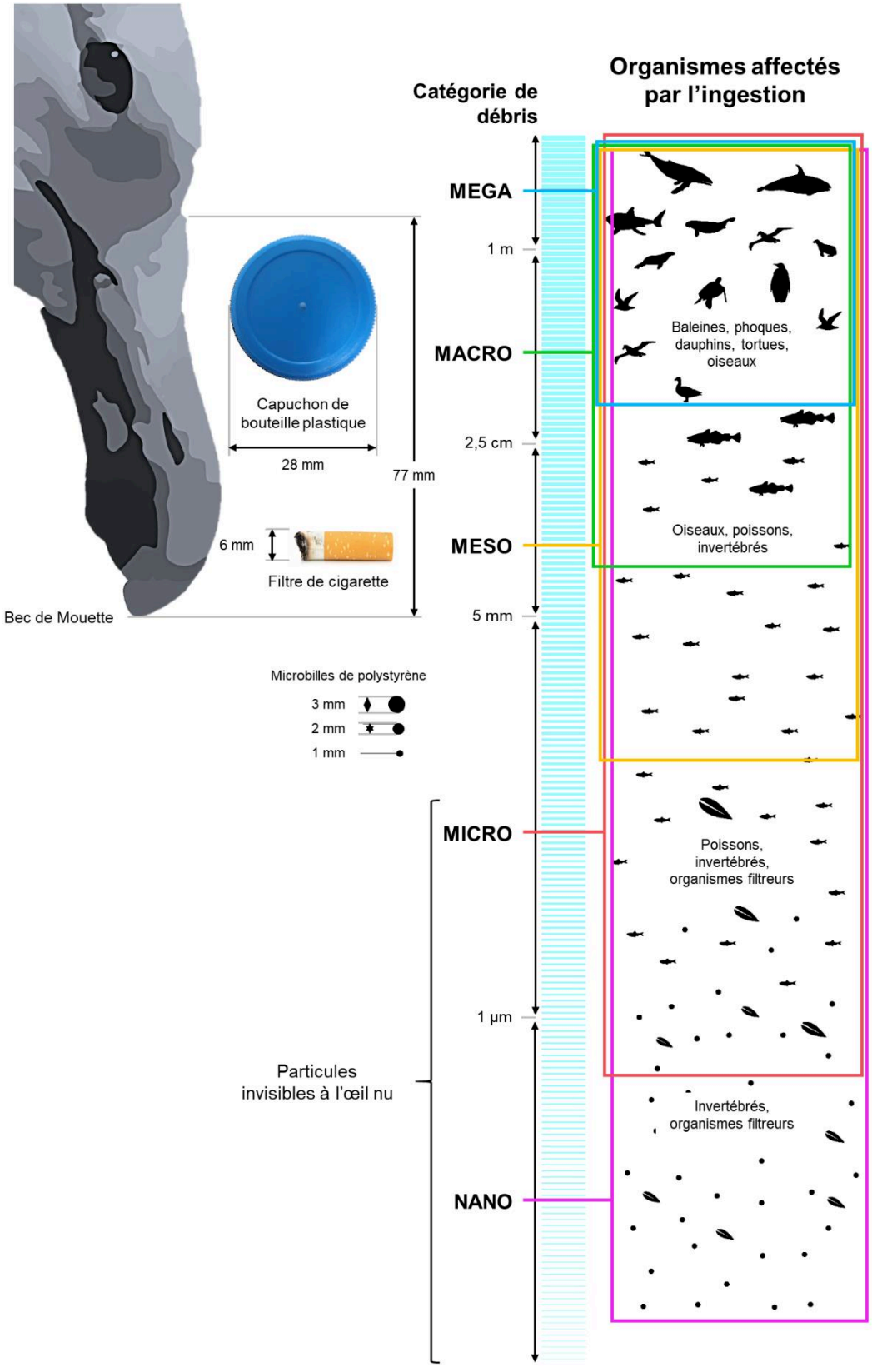


Figure 9. Organismes marins potentiellement impactés par les différentes classes de taille des débris plastiques. L'ingestion de méso-, macro- et mégaplastiques se réduit à certains organismes présents à des niveaux trophiques supérieurs tandis que l'ingestion de micro- et nanoplastiques concerne la totalité du réseau trophique *via* les maillons inférieurs (*e.g.* zooplancton, larves). Il est important de noter que l'ingestion de nanoplastiques n'a pas encore été démontrée *in situ* en raison des verrous méthodologiques relatifs à leur suivi. *Modifié d'après Fabres et al. (2016).*

3.2.2. Conséquences biologiques

De manière générale, l'ingestion de plastiques peut entraîner plusieurs effets physiques qui agissent sur la santé de l'organisme. Par exemple, le volume de plastique ingéré peut considérablement réduire la capacité de l'estomac (McCauley et Bjorndal, 1999), ce qui peut entraîner un manque d'appétit et/ou un faux sens de satiété (Kühn *et al.*, 2015). Le plastique peut également provoquer une obstruction du tractus digestif ou des blessures internes (*e.g.* perforation de l'intestin, lésions ulcéreuses) pouvant conduire à une inflammation digestive, une porosité digestive notamment aux agents pathogènes, voire la mort de l'animal (Law, 2017). En plus de ces effets physiques, les débris plastiques dans l'envionnement sont aussi associés à un mélange complexe de substances chimiques qui peuvent entraîner des effets toxiques pour les organismes (Teuten *et al.*, 2009). En raison de leur persistance, bioaccumulation et/ou toxicité, ces substances sont pour beaucoup considérées comme une priorité par l'agence de la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA) et l'Union Européenne (Rochman, 2016a). Sur la totalité de ces polluants jugés prioritaires, 78% sont associés aux débris plastiques (Rochman *et al.*, 2013a). Parmi ces composés, certains sont initiallement présents dans la matière plastique (*e.g.* additifs, sous-produits de fabrication) et/ou d'autres sont des polluants environnementaux (*e.g.* polluants organiques persistants [POP], métaux) adsorbés par les débris durant leur séjour en mer (Mato *et al.*, 2001 ; Lithner *et al.*, 2011 ; Holmes *et al.*, 2012). Une fois les débris plastiques ingérés, ces substances peuvent se diffuser dans les tissus de l'organisme et s'accumuler (Wardrop *et al.*, 2016). Cependant, la faune peut être exposée à d'autres sources de contamination chimique dans le milieu naturel (*e.g.* eau de mer environnante, nourriture diverse). Il est donc difficile de démêler l'origine exacte des substances chimiques retrouvées chez certains organismes *in situ* (Paul-Pont *et al.*, 2018). Pour ces raisons, les effets chimiques sur la faune marine sont moins décrits que les phénomènes d'enchevêtrement ou l'impact physique des débris ingérés (Gall et Thompson, 2015). Le effets (éco)toxicologiques démontrés expérimentalement en conditions de laboratoire seront néanmoins présentés de manière plus approfondie dans la section 6.2. Enfin, bien que les effets liés à l'ingestion puissent être léthaux, ils semblent moins fréquents que ceux liés à l'enchevêtrement (4% contre 79% des cas rapportés ; Kühn *et al.*, 2015).

3.3. Autres interactions

En plus des phénomènes d'enchevêtrement et d'ingestion, d'autres interactions peuvent intervenir entre les débris plastiques et la faune environnante. C'est le cas par exemple des phénomènes d'éclosions de tortues sur certaines plages polluées par les déchets plastiques. Il a été démontré que cette pollution entravait la migration des nouveaux-nés vers l'océan (Özdilek, 2006). Ces déchets présents sur les plages ont également un impact sur l'activité de fouissement

du crabe fantôme *Ocypode quadra* (Widmer et Hennemann, 2010). Globalement, les débris plastiques n'affectent donc pas seulement les espèces marines à l'échelle de l'organisme et populationnelle ; ils ont également la capacité de bouleverser l'équilibre biologique des écosystèmes. Cela a notamment été montré avec les débris plastiques qui s'accumulent sur les fonds marins et qui peuvent agir comme barrière, empêchant le passage de la lumière et réduisant l'apport d'oxygène et de matière organique aux sédiments (**Figure 10**). Ainsi, Green *et al.* (2015) ont démontré par le biais d'une expérience sur le terrain que ces phénomènes « d'étouffement » (en l'occurrence une privation de lumière) peuvent rapidement modifier les assemblages écologiques et le bon fonctionnement des écosystèmes. D'autres études ont démontré que les débris plastiques pouvaient modifier les écosystèmes récifaux en endommageant les coraux par abrasion et/ou collision (Richards et Beger, 2011 ; Lamb *et al.*, 2018). Les débris plastiques peuvent également servir de support de fixation et être colonisés par certains organismes (Kiessling *et al.*, 2015). Certaines espèces limitées autrefois par un manque de support pour se réfugier ou réaliser leur cycle biologique, prolifèrent au détriment de leur proies. C'est le cas par exemple de l'espèce *Halobates sericeus* (araignée d'eau) qui utilise les débris plastiques comme support de ponte (Goldstein *et al.*, 2012). Ainsi, il est clairement établi que les débris plastiques peuvent servir de support et transporter des organismes sur de longues distances (Calder *et al.*, 2014). Cet effet « radeau », impliquant majoritairement des débris plastiques, a permis le transport de près de 300 espèces des côtes japonaises aux côtes ouest américaines suite au tsunami de 2011 (Calder *et al.*, 2014). Cette caractéristique suscite l'inquiétude car les débris plastiques pourraient agir comme vecteur d'espèces invasives et/ou pathogènes. Bien que cela fasse toujours l'objet d'hypothèses (Rochman *et al.*, 2016), Reisser *et al.* (2014) ont pu démontrer l'implication des microplastiques dans le transport de bactéries, cyanobactéries, champignons et autres micro-organismes de la côte australienne vers le large.

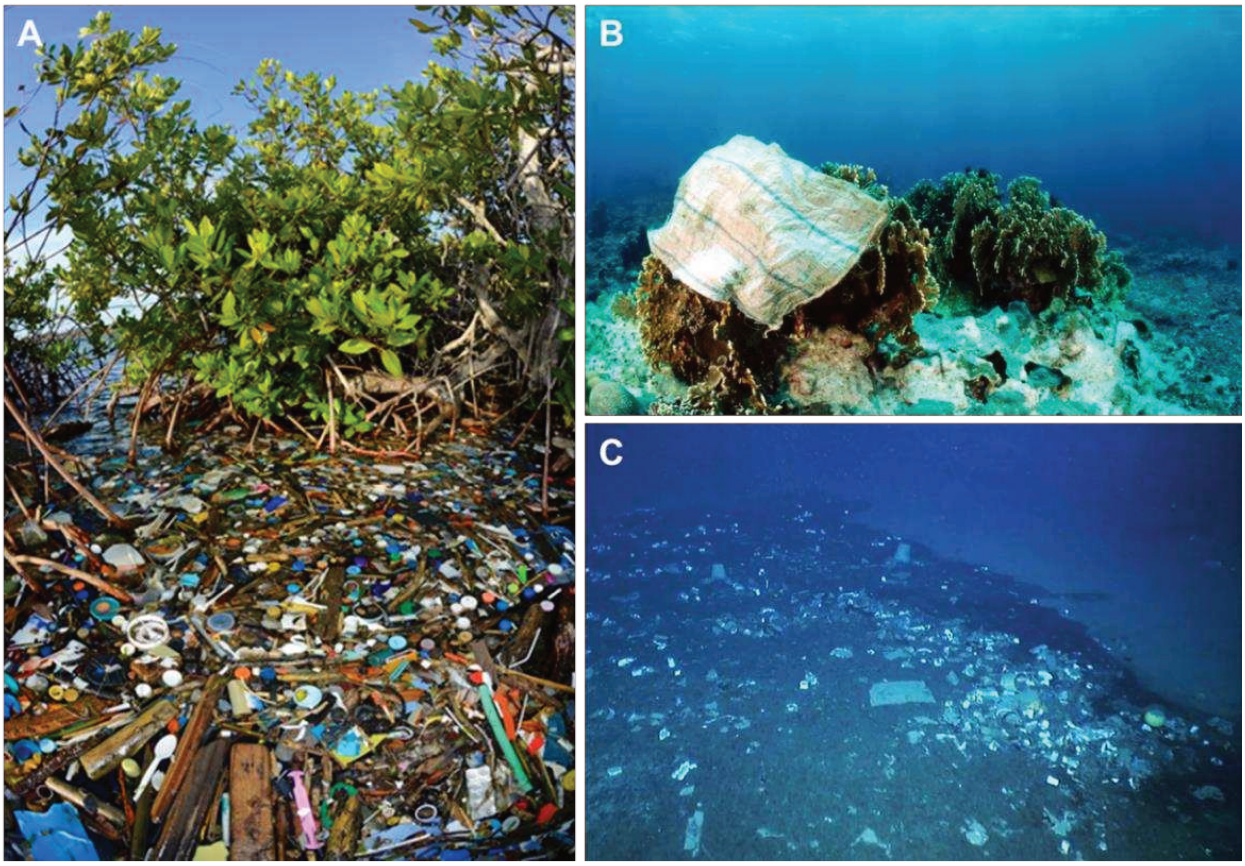


Figure 10. Phénomènes « d'étouffement » occasionés par les déchets plastiques dans des écosystèmes tels que les mangroves (**A**), les récifs corraliens (**B**), et le fond des océans (**C**). *Crédits : (A) Barry Brown ; (B) World Wildlife Fund ; (C) Extrait de la vidéo réalisée par l'Ifremer dans les canyons du fond de la Mer Méditérannée.*

4. Enjeux face à la prédominance des microplastiques

Bien que de nombreux travaux se soient portés sur l'impact écologique des débris plastiques, la communauté scientifique s'accorde à dire que la réelle ampleur de ces impacts *in situ* reste peu connue. En effet, la taille des débris pose problème. Les travaux d'Eriksen *et al.* (2014) mettent en évidence des gradients de concentrations parfaitement opposés entre la masse de plastiques flottant à la surface des océans (*i.e.* 269 000 tonnes, **Figure 11**A) et le nombre de particules plastiques (*i.e.* plus de 5 milliards de débris, **Figure 11**B). Pourtant, cette notion est primordiale dans l'évaluation de la contamination et des risques écologiques que peuvent représenter les débris plastiques à leur échelle respective (GESAMP, 2015).

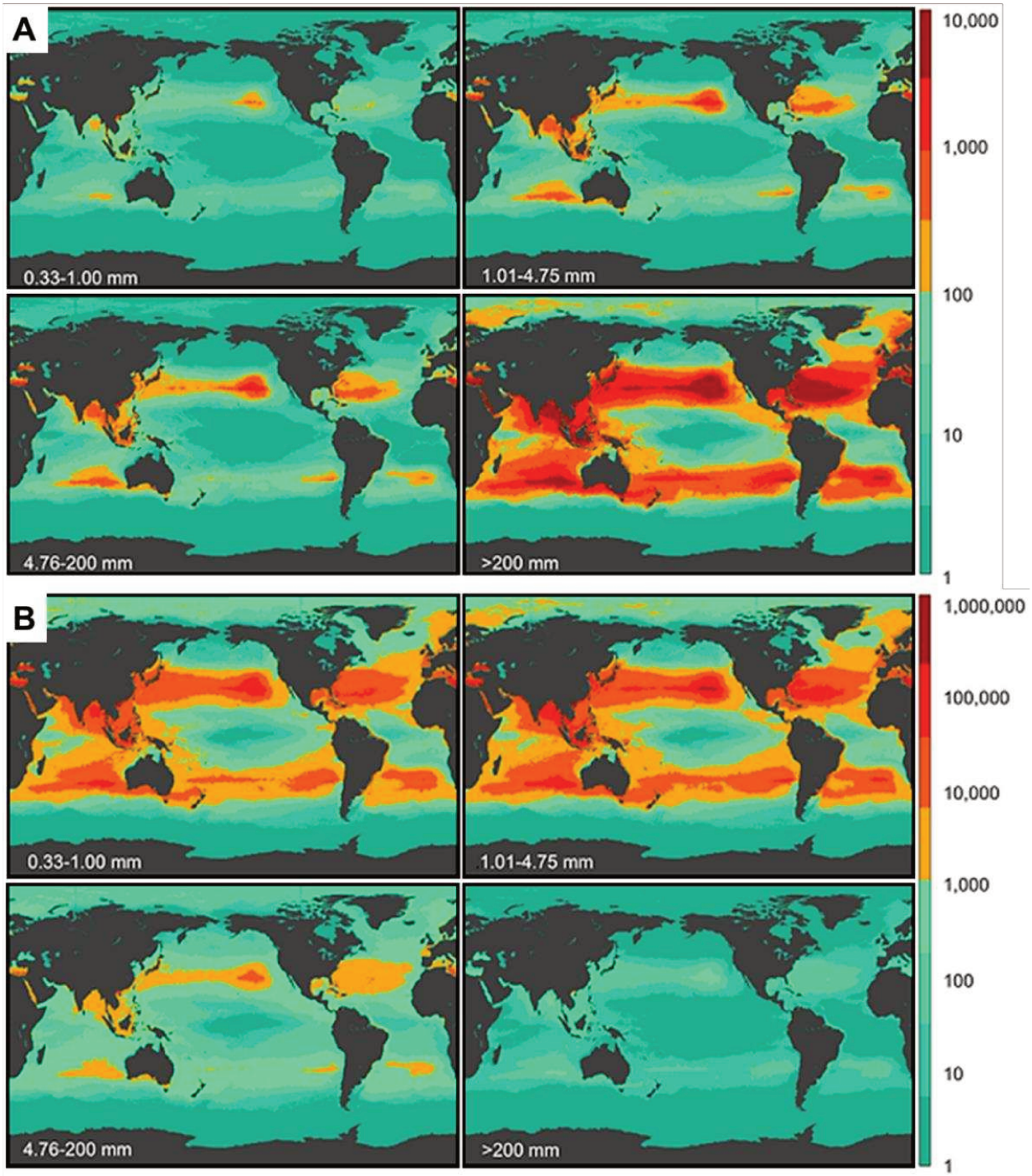


Figure 11. Modélisation de la densité de plastique flottant à la surface des océans en fonction de la masse (**A** ; g/km^2) et du nombre de débris (**B** ; particules/km^2) selon 4 classes de tailles (0,33-1,00 mm ; 1,01-4,75 mm ; 4,76-200 mm et > 200 mm). *D'après Eriksen et al. (2014) – PloS ONE.*

Pour une masse de plastiques donnée, plus la taille des débris diminue, plus le nombre de débris augmente. Les plus petites particules présentent donc un plus grand potentiel d'interactions biologiques aussi bien directes (*i.e.* ingestion) qu'indirectes (*i.e.* transfert trophique)

au sein de la chaîne alimentaire (**Figure 10**). Ainsi, d'une pollution macroscopique démesurée, la perception des déchets plastiques en mer change progressivement d'échelle et se charge de problématiques nouvelles. Cette menace émergente est incarnée par les microplastiques qui représentent près de 92% des débris plastiques océaniques (Eriksen *et al.*, 2014 ; van Sebille *et al.*, 2015). Leurs impacts potentiels au niveau des écosystèmes suscitent effectivement l'inquiétude car les connaissances à leur sujet sont encore limitées dans l'environnement naturel.

4.1. Les microplastiques : définition

Rapporté pour la première fois en 2004, le terme « microplastique » était utilisé pour décrire les fragments de plastique d'environ 20 µm de diamètre. Ces débris ont été signalés dans les sédiments des zones intertidales et subtidales peu profondes ainsi que dans les eaux de surface au nord-ouest de l'Europe (Thompson, 2004). Des recherches ultérieures ont mis en évidence la présence de particules de taille similaire dans les eaux peu profondes autour de Singapour (Ng et Obbard, 2006). Cependant, alors que ces premiers rapports utilisent ce terme pour désigner ces particules microscopiques, aucune définition spécifique n'a encore été attribuée aux microplastiques. En 2008, un séminaire international sur les microplastiques s'est tenu à la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration, USA) dans le but de définir de façon plus large ces débris plastiques et d'inclure toutes les particules inférieures à 5 mm de diamètre (Arthur *et al.*, 2009). Cette définition fait l'objet de débats vis-à-vis de la limite supérieure (*i.e.* < 5 mm) à adopter, mais la DCSMM (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin, UE) s'est néanmoins calquée sur le modèle américain et l'utilise également pour catégoriser les microplastiques (Galgani *et al.*, 2013). En revanche, il existe peu de consensus sur la taille minimale attribuée aux microplastiques pour les dissocier des nanoplastiques (Thompson, 2015). Certains auteurs se réfèrent au changement radical de comportement des particules qui interviendrait à des tailles < 1 µm (Gigault *et al.*, 2018) ; d'autres se réfèrent à la définition des nanomatériaux, *i.e.* < 100 nm, dont les propriétés et le comportement des particules à cette limite de taille favorisent les interactions avec les molécules biologiques (Koelmans *et al.*, 2015). Au niveau physiologique et toxicologique, cette caractéristique entraînerait des mécanismes d'intéractions et de toxicité bien distincts (Lee *et al.*, 2013 ; Jeong *et al.*, 2016, 2017). Pour ces raisons et dans l'attente d'une définition commune et standardisée, cette dernière classification sera utilisée pour dissocier les nanoplastiques (< 100 nm) des microplastiques (100 nm - 5 mm).

4.2. Origines des microplastiques dans l'environnement marin

En fonction de leur origine, les microplastiques (MP) sont classés en deux catégories : les MP primaires et les MP secondaires (Barnes *et al.*, 2009). Les MP primaires sont directement

rejetés dans l'environnement naturel sous forme de microparticules (**Figure 12**A) tandis que les MP secondaires sont issus de la fragmentation en milieu aquatique des objets plus volumineux (**Figure 12**B) comme décrit précédemment au point 2.3 (Andrady, 2011).

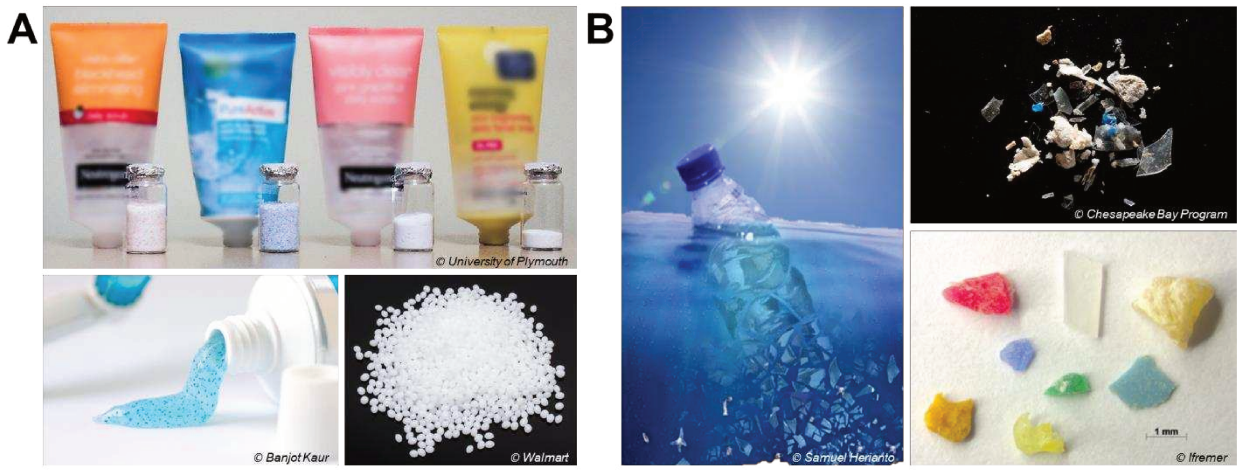


Figure 12. Illustrations de microplastiques primaires (**A**) et secondaires (**B**).

Les MP primaires sont utilisés pour une large gamme d'applications. Sous forme de granulés (~ 5 mm de diamètre) ou de poudres (< 0,5 mm), ils sont utilisés comme matière première en plasturgie pour la production d'objets plastiques (**Figure 12**A). La présence de ces particules connues sous le nom de « larmes de sirènes » a largement été rapportée dans les rejets d'effluents industriels (Thompson, 2015). Les petites particules de plastiques (~ 0.25 mm) sont également utilisées comme abrasifs de remplacement dans le sablage industriel (Cole *et al.*, 2011) ou dans certains produits cosmétiques comme exfoliants (*e.g.* crêmes, gels douche, dentifrices ; **Figure 12**A) (Fendall et Sewell, 2009 ; Duis et Coors, 2016). En 2012, 6% des produits cosmétiques européens contenaient des microbilles de plastique (Duis et Coors, 2016). Fendall et Sewell (2009) ont constaté que ces microbilles passaient directement dans les réseaux d'eaux usées et étaient trop petites pour être retenues par les systèmes de traitement des stations d'épuration. Certaines matières plastiques se fragmentent également en MP lors de leur usage et nettoyage quotidien. L'étude de Browne *et al.* (2011) portant sur la pollution en MP des rivages de 18 sites dans le monde, a permis de constater que l'une des sources les plus importantes de MP primaires dans le milieu marin sont les eaux usées polluées par les fibres de vêtements synthétiques qui émanent des machines à laver. Cependant, bien que les MP primaires puissent être dominants dans les effluents d'eaux usées des zones urbaines (Mani *et al.*, 2015), les MP primaires ne représenteraient que 0,1 à 3% des MP présents dans les océans (Lassen *et al.*, 2015). Les MP primaires seraient donc d'une importance mineure face à la prédominance et l'abondance des MP secondaires (Hüffer *et al.*, 2017). Il est cependant

important de noter qu'une grande majorité des modèles s'attache à l'échelle océanique et considère très peu les zones côtières où la part de MP primaires peut s'avérer largement sous-estimée.

5. Évaluation de la contamination en microplastiques

Contrairement aux meso- et macroplastiques, l'évaluation de la contamination en MP est considérée comme une composante largement sous-étudiée du fait de sa complexité (Doyle *et al.*, 2011) et de verrous méthodologiques. En effet, les limites des équipements scientifiques restreignent la détection, le suivi et la mesure réelle de la contamination microplastique. À ce jour, aucune donnée *in situ* n'est disponible pour les particules < 10 µm (Schwaferts *et al.*, 2019). Or, des études réalisées sur le terrain témoignent que, pour une gamme de taille comprise entre 10 et 100 µm, l'abondance des petites particules plastiques augmente d'un facteur 1,96 (Enders *et al.*, 2015) à 2,13 (Erni-Cassola *et al.*, 2017) à mesure que leur taille diminue. En tenant compte de la fragmentation progressive de ces particules, pouvant atteindre des tailles nanométriques d'après certaines données expérimentales (Gigault *et al.*, 2016 ; Lambert et Wagner, 2016), des niveaux élevés de contamination en particules < 10 µm sont attendus (GESAMP, 2015). À ces verrous méthodologiques s'ajoute la variabilité spatiale et temporelle liée aux modèles courantologiques et saisonniers et la nécessité de prendre en compte la bande côtière la plus sujette aux pressions anthropiques (Ryan *et al.*, 2009 ; Doyle *et al.*, 2011). Malgré ce challenge analytique pour la communauté scientifique (Huvet *et al.*, 2016 ; Gigault *et al.*, 2018), différentes méthodes d'échantillonnage, de traitement, de détection et d'identification des MP (> 10 µm) ont été développées ces dernières années et permettent d'améliorer nos connaissances dans la thématique. La standardisation de protocoles en fonction des matrices environnementales (*i.e.* eau, sédiment, biote) manque cependant au progrès scientifique, notamment pour la comparaison des résultats inter-études.

5.1. Méthodologie d'échantillonnage

5.1.1. Eau de mer

Depuis la première étude menée par Carpenter *et al.* (1972), de nombreux travaux se sont portés sur l'évaluation de la contamination en MP dans les eaux de surface de tous les grands océans (Cózar *et al.*, 2014). Actuellement, plus de 96% des études sur le suivi des MP dans l'environnement sont consacrées à la contamination de l'eau de mer (Li *et al.*, 2018). Ces travaux portent majoritairement sur la contamination des eaux de surface bien qu'ils se consacrent de plus en plus à l'étude de la colonne d'eau. En raison des concentrations relativement faibles

rencontrées dans l'environnement marin, l'évaluation de la contamination de l'eau nécessite généralement des grands volumes d'eau échantillonnée. Ainsi, les échantillons d'eau de surface sont généralement prélevés à l'aide d'un filet tracté par bateau. Le filet manta (**Figure 13**A) est utilisé principalement en eau calme (Doyle *et al.*, 2011 ; Eriksen *et al.*, 2013) tandis que le filet à neuston (catamaran) est favorable pour des conditions plus agitées (**Figure 13**B, Carpenter *et al.*, 1972 ; Colton *et al.*, 1974 ; Morét-Ferguson *et al.*, 2010). Cependant, l'échantillonnage en eau agitée n'est pas recommandé à cause du brassage qui redistribue les MP dans le(s) permier(s) mètre(s) de la colonne d'eau et rend les données quantitatives peu robustes. Les échantillons de pleine eau quant à eux, sont le plus souvent prélevés à l'aide d'un filet à plancton (**Figure 13**C) ou bongo (**Figure 13**D) qui permettent un prélèvement vertical ou horizontal (Doyle *et al.*, 2011). La maille de filet fréquemment utilisée est de 333-335 µm (Sutton *et al.*, 2016 ; van der Hal *et al.*, 2017 ; Güven *et al.*, 2017 ; Frère *et al.*, 2017) et l'utilisation de mailles inférieures ou supérieures peut produire de grandes variations dans la quantité de particules collectées (Cole *et al.*, 2011). Le volume d'eau filtrée est généralement enregistré par un débimètre monté à l'ouverture du filet, permettant la normalisation du volume filtré (en complément de la normalisation par surface estimée par suivi GPS lors du trait de filet) et de calculer la concentration de MP (nombre/poids) par unité de volume et/ou de surface. La vitesse d'échantillonnage des eaux de surface dépend des conditions météorologiques et des courants, mais se situe généralement entre 1 et 5 nœuds (*i.e.* ~ 2-9 km h^{-1}). La norme établie par la DCSMM préconise une vitesse < 3 nœuds (*i.e.* < 5,5 km h^{-1}). Le temps de prélèvement oscille quant à lui entre quelques minutes et plusieurs heures en fonction des concentrations en plancton qui peuvent considérablement entraver le traitement ultérieur des échantillons (Boerger *et al.*, 2010). À l'issue du prélèvement, toute la longueur du filet est soigneusement rincée par l'extérieur et l'échantillon est concentré au fond du filet dans un collecteur (Doyle *et al.*, 2011). L'échantillon est ainsi collecté en s'assurant de ne laisser aucun résidu dans le collecteur en le rinçant. Ces phases de rinçage sont importantes pour éviter la contamination de l'échantillon suivant. L'échantillon est nettoyé de ces gros débris, rincé, puis fixé au formol et/ou directement congelé à –20°C avant traitement en laboratoire.

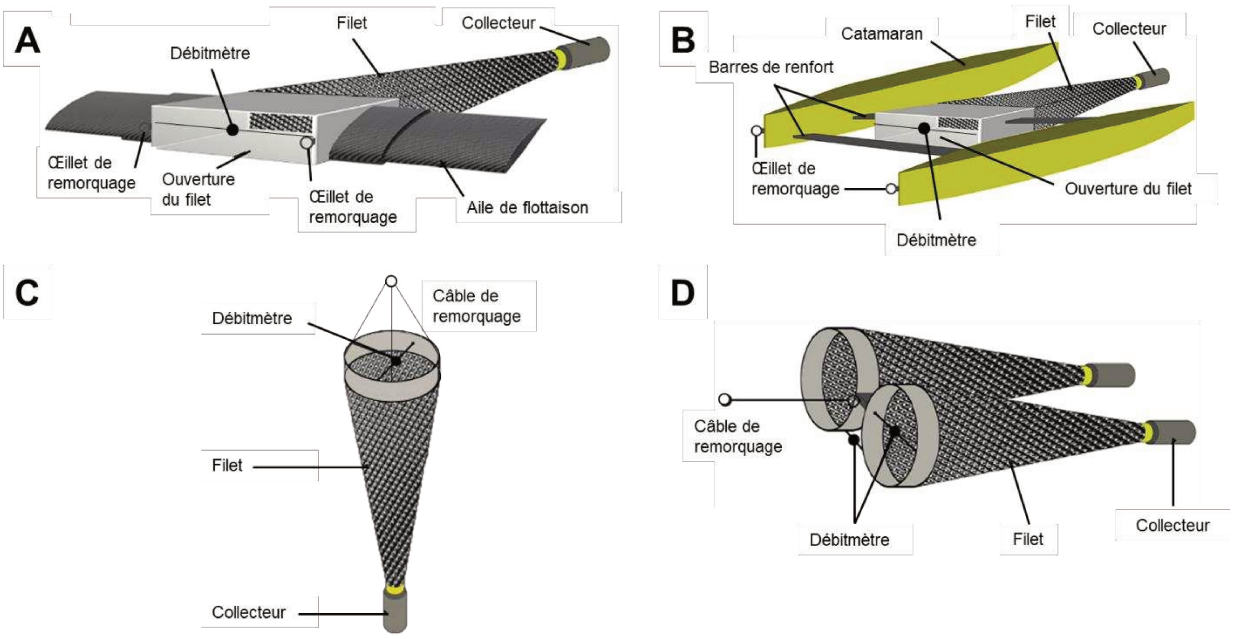


Figure 13. Équipements utilisés pour l'échantillonnage de microplastiques dans les eaux de surface (**A**, **B**) et la colonne d'eau (**C**, **D**). (**A**) Filet manta, (**B**) filet à neuston (catamaran), (**C**) filet à plancton (prélèvement vertical) et (**D**) filet bongo (prélèvement horizontal). *Modifié d'après Crawford et Quinn (2017) – Microplastic Pollutants.*

5.1.2. Sédiments

L'évaluation de la présence de MP sur les plages et les estuaires se fait plus facilement puisque l'échantillonnage peut être réalisé directement à l'aide de cuillères ou spatules en acier inoxydable (Nor et Obbard, 2014) sur une zone délimitée par un cadre. L'échantillonnage peut également se faire par le biais d'un carottier (*e.g.* Vianello *et al.*, 2013) ou une benne de type Van Veen grab (*e.g.* Frère *et al.*, 2017). Ces méthodes permettent de recueillir les sédiments superficiels (entre 5 et 30 cm de profondeur) dont la quantité rapportée dans la littérature varie entre < 0,5 et 10 kg (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). A l'inverse, l'échantillonnage de sédiments provenant des fonds marins demande davantage de logistique et implique le plus souvent un navire muni d'un chalut de profondeur, d'une benne, ou d'un carrotier (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Le volume de l'échantillon, l'instrument utilisé et le temps nécéssaire à sa récupération vont fortement dépendre de la profondeur à laquelle l'échantillonage est réalisé. Les échantillons de sédiments sont généralement conservés à –20°C ou bien séchés avant traitement en laboratoire.

5.1.3. Biote

Concernant les organismes vivants, la contamination en MP est évaluée sur des échantillons issus de l'environnement naturel ou d'élevage. Au sein du biote marin, les organismes couramment étudiés sont les poissons (Lusher *et al.*, 2013 ; Foekema *et al.*, 2013), les tortues,

les oiseaux de mer (van Franeker *et al.*, 2011 ; Wedemeyer-Strombel *et al.*, 2015), les bivalves (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014 ; J. Li *et al.*, 2016) et les organismes planctoniques (Setälä *et al.*, 2014). Ces échantillons proviennent le plus souvent d'une capture (*e.g.* pêche à la ligne, pièges, nasses) mais peuvent également être collectés par filet manta/Bongo (*i.e.* organismes planctoniques) ou par chalutage à différentes profondeurs (*e.g.* poissons) ainsi qu'être prélevés à la main, notamment sur l'estran (*e.g.* bivalves, crustacés). Néanmoins, certains échantillons sont parfois directement récupérés dans des poissonneries ou des fermes aquacoles (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014 ; Davidson et Dudas, 2016 ; Lusher *et al.*, 2017b). Les organismes échantillonnés sont alors généralement disséqués afin de suivre la contamination en MP dans divers tissus et organes et notamment dans le tube digestif. La conservation de ce dernier va dépendre de la taille de l'individu ; si celui-ci est grand alors le tube digestif peut être isolé et stocké, s'il est petit alors l'individu sera analysé *in toto* (Galgani *et al.*, 2013). Par ailleurs, après avoir été collectés, les échantillons sont congelés à –20°C ou bien conservés dans un fixateur (*e.g.* formol, ethanol) aussi rapidement que possible (Hermsen *et al.*, 2018). En effet, après l'échantillonnage, des phénomènes d'excrétion peuvent survenir entre 30 min et 150 h en fonction des organismes (Lusher *et al.*, 2017b). La régurgitation du bol alimentaire doit également être prise en compte dans l'échantillonnage, en particulier pour les poissons d'eaux profondes (Lusher *et al.*, 2017b).

5.2. Purification des échantillons

Le traitement des échantillons, et plus particulièrement des échantillons d'eau, représente une étape critique et extrêmement chronophage dans le suivi des MP *in situ*. Les démarches scientifiques visant à collecter un maximum de particules et d'en étudier de plus en plus petites ont des conséquences sur la faisabilité et l'efficacité du traitement des échantillons en aval. En effet, la taille d'échantillonnage souvent ≤ 335 µm augmente considérablement la quantité de particules plastiques collectées (Song *et al.*, 2015a ; Barrows *et al.*, 2017) mais emprisonne également une biomasse biologique (*i.e.* plancton) non-négligeable. Afin d'isoler les MP de cette matrice biologique, plusieurs méthodes de séparation par flottaison ont été utilisées (*e.g.* flottaison simple, élutriation, densité de séparation) (Claessens *et al.*, 2013 ; Hall *et al.*, 2015). La méthode communément utilisée est l'utilisation de solution sursalée (*i.e.* densité de séparation) *via* l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) dans l'échantillon (Ng et Obbard, 2006 ; Browne *et al.*, 2011 ; Hall *et al.*, 2015). Cependant, le NaCl possède une densité (~ 1,2 g cm^{-3}) trop faible pour permettre la flottaison de tous les polymères (*e.g.* PET, PUR, PVC). Bien que le iodure de sodium (NaI ; 1,6-1,8 g cm^{-3}) et le chlorure de zinc ($ZnCl_2$; 1,5-1,7 g cm^{-3}) soient des solutions alternatives pour amélirorer cette séparation (Rocha-Santos et Duarte, 2015), une grande partie de la matière organique flotte également, ce qui rend cette approche limitante.

Cette méthode s'avère néanmoins efficace pour séparer les MP du sédiment (~ 2.65 $g.cm^{-3}$) (revue dans la thèse de Mikaël Kedzierski, 2017).

À l'exception des échantillons de sédiments, les échantillons d'eau et de biote sont généralement pré-traités par digestion chimique (acide, alcaline ou oxidante) ou enzymatique pour se débarrasser le plus possible de la matière organique (MO). Ces méthodes ont donc été développées pour isoler les MP de manière plus efficace. Parmi les digestions chimiques, l'acide nitrique (HNO_3) s'avère le plus efficace pour digérer la MO (94-98%) par rapport à l'acide chlorhydrique (HCl), l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH) ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Claessens *et al.*, 2013). Néanmoins, il a été démontré que le KOH et l'H_2O_2 sont plus adaptés car l'HNO_3 et le NaOH peuvent dissoudre certains polymères tandis que l'HCl ne digère pas suffisamment la MO (Cole *et al.*, 2011 ; Claessens *et al.*, 2013 ; Foekema *et al.*, 2013 ; Dehaut *et al.*, 2016). Une étude récente a tout de même démontré l'efficacité du couplage KOH et HNO_3 (Schirinzi *et al.*, 2020). D'autres études ont également portées sur l'efficacité de la digestion enzymatique (*e.g.* cellulase, lipase, chitinase, protease, proteinase-K) permettant de réduire considérablement la MO (Cole *et al.*, 2011 ; Löder *et al.*, 2017). Cependant, la digestion enzymatique est adaptée à des petits volumes d'échantillons et l'approvisionnement en enzymes représente un coût important (Hurley *et al.*, 2018). Finalement, afin de purifier au maximum l'échantillon, certains protocoles ont été développés en couplant plusieurs étapes de digestion (chimique et enzymatique) pour optimiser et faciliter au mieux l'analyse ultérieure des particules (Catarino *et al.*, 2017). Une fois purifiés, les échantillons sont filtrés sur des filtres en fibre de verre ou en oxyde d'aluminium en fonction de la méthode d'identification des polymères appliquée par la suite. Ces filtres sont ensuite séchés à l'étuve avant les phases de caractérisation, de quantification et d'identification.

5.3. Caractérisation et quantification des particules

Après séparation et purification, les particules doivent être isolées de la matrice résiduelle présente sur le filtre. La première étape fréquemment réalisée est une observation visuelle. Les grosses particules peuvent être triées à l'œil nu (Morét-Ferguson *et al.*, 2010) tandis que les plus petites sont généralement directement observées sur le filtre par microscopie (Doyle *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2015a). La caractérisation de la distribution des tailles de particules est alors réalisée. Elle dépend des méthodes d'échantillonnage (*i.e.* maille du filet) et de tri (*i.e.* maille de tamisage) utilisées en amont (Rocha-Santos et Duarte, 2015). De plus, l'aggrégation de particules plus petites sur des débris plus grands qui composent l'échantillon est un phénomène courant (Zhao *et al.*, 2017). Ainsi, il est plus fiable de mesurer les particules présentes sur le filtre que de se fier aux gammes de tailles d'échantillonnage et de tamisage. La caractérisation de la taille des particules et leur quantification se font donc usuellement par microscopie (Hidalgo-Ruz

et al., 2012 ; Liebezeit et Dubaish, 2012 ; Dekiff *et al.*, 2014). Dans un second temps, les caractéristiques telles que la couleur, la forme (*e.g.* fragment, fibre, mousse, granule) et la texture de surface peuvent contribuer à dissocier les MP des autres particules composant l'échantillon (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012 ; Shim *et al.*, 2017). L'identification visuelle est une technique moins fastidieuse, moins lente et peu coûteuse mais qui présente néanmoins des limites concernant la nature réelle des particules (Song *et al.*, 2015a). Par exemple, deux fibres « bleues » distinctes et similaires selon une identification visuelle par microscopie se sont révélées être deux particules de nature différente après identification par spectroscopie : l'une en polyacrylique (**Figure 14**A) et l'autre en coton (**Figure 14**B), (Dyachenko *et al.*, 2017). En résumé, même une personne expérimentée ne peut pas distinguer sans ambiguïté tous les MP potentiels, ni risquer une confusion avec des grains de sable, des fragments de chitine, ou autres particules naturelles. Le taux d'erreur du tri visuel rapporté dans la littérature varie de 20% (Eriksen *et al.* 2013) à 70% (Hidalgo-Ruz *et al.* 2012), et augmente avec la diminution de la taille des particules identifiées. Ainsi, ce n'est qu'en couplant cette première approche visuelle à des techniques d'analyses plus robustes, telles que les spectroscopies infrarouge et Raman, qu'il est possible de confirmer définitivement l'identité des particules suspectes et le type de polymère (Song *et al.*, 2015a).

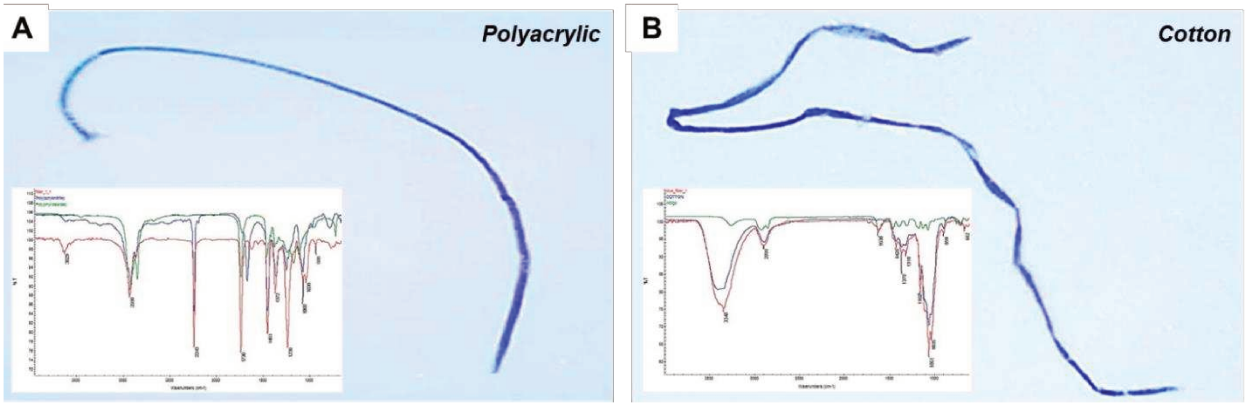


Figure 14. Représentation de deux fibres similaires mais de nature différente identifiée par FTIR : l'une comme polyacrilique (**A**) et l'autre comme coton (**B**). *Modifié d'après Dyachenko et al. (2017) – Analytical Methods.*

5.4. Identification des particules

Au cours des dernières années, des méthodes analytiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR ; Löder *et al.*, 2015), la spectroscopie Raman (Frère *et al.*, 2016), la désorption thermique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (TD-GC/MS ; Duemichen *et al.*, 2014), ou encore la pyrolyse-GC/MS (Pyr-GC/MS ; Fischer et Scholz-Böttcher, 2017) ont été améliorées et appliquées de manière

intensive aux analyses de MP dans les matrices environnementales. À ce jour, les deux techniques de caractérisation les plus utilisées pour discriminer les particules plastiques des particules naturelles sont la spectroscopie Raman et FTIR.

5.4.1. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique simple qui a été utilisée pour identifier des MP dans différentes matrices environnementales avec une grande fiabilité (Murray et Cowie, 2011 ; Imhof *et al.*, 2012 ; Cole *et al.*, 2013 ; Van Cauwenberghe *et al.*, 2013). Lors de l'analyse, la particule ciblée est irradiée par un laser de longueur d'onde variable (généralement entre 500 et 800 nm). L'interaction entre le laser et les molécules/atomes composant la particule (vibration, rotation et autres interactions à basse fréquence) entraîne des différences de fréquences entre la lumière rétrodiffusée et le laser irradiant. Ces différences correspondent au « décalage » Raman qui, une fois détecté, conduit à un spectre Raman spécifique à la substance analysée. Étant donné que les polymères plastiques possèdent des spectres Raman caractéristiques, la technique peut être appliquée pour identifier des polymères en quelques minutes par comparaison avec des spectres de référence spécifiques à chaque polymère et enregistrés dans une base de données (**Figure 15**A). Par ailleurs, la spectroscopie Raman est une technique « non destructive » ; ainsi, une grande quantité de particules triées visuellement peuvent être analysées. Cette technique peut également être couplée à de la microscopie (micro-Raman), ce qui permet d'identifier une large gamme de taille de particules > 1 µm (Cole *et al.*, 2013 ; Ribeiro-Claro *et al.*, 2017). De la même manière, elle peut être couplée à de la microscopie confocale à balayage laser de sorte à localiser et identifier des particules dans des tissus biologiques (Cole *et al.*, 2013). Néanmoins, la spectroscopie Raman possède une limite : les échantillons fluorescents excités par le laser (*e.g.* résidus d'origine biologique) ne peuvent pas être mesurés car ils empêchent la génération de spectres Raman interprétables (Löder et Gerdts, 2015) rendant l'identification des particules impossible. Il est donc souvent intéressant de coupler cette technique avec une autre approche méthodologique comme la spectroscopie FTIR.

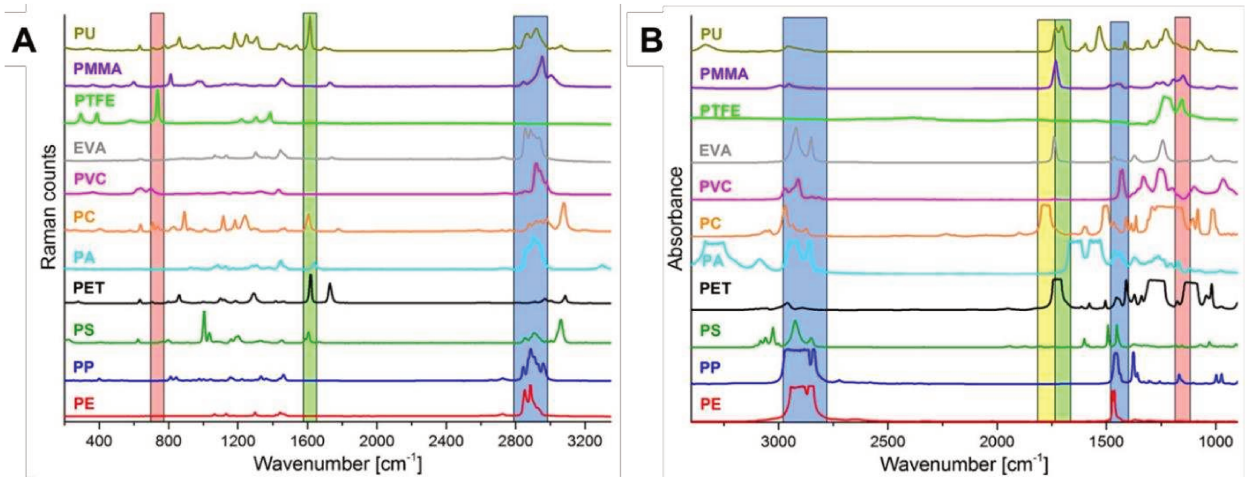


Figure 15. Spectres Raman (**A**) et FTIR (**B**) des polymères synthétiques standards les plus courants. Pour l'analyse Raman, la gamme spectrale de 2780-2980 cm^{-1} (bleu) permet d'identifier le PE, PP, PA, PVC, EVA, PMMA et PU. La gamme spectrale de 2780-2980 cm^{-1} (vert) permet l'identification du PS, PET, PC et PU. Le PTFE peut être identifié en utilisant la gamme spectrale de 709-759 cm^{-1} (rouge). Concernant l'analyse FTIR, la gamme spectrale 2980-2780 cm^{-1} (bleu) permet d'identifier le PE, PP, (PS), PA, (PVC) et EVA. Les gammes spectrales de 1800-1740 cm^{-1} (jaune) et 1760-1670 cm^{-1} (vert) permettent d'identifier respectivement le PC et le PET, polyester, acrylique et EVA. La gamme spectrale de 1480-1400 cm^{-1} (bleu) permet de détecter à nouveau le PE, PP, PS, (PET), (PA) et surtout le PVC. Le PTFE peut être identifié en utilisant la gamme spectrale de 1174-1087 cm^{-1} (rouge). *D'après Käppler et al. (2016) – Analytical and Bioanalytical Chemistry.*

5.4.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Semblable à la spectroscopie Raman, la spectroscopie FTIR offre la possibilité d'une identification précise des particules en fonction de leur spectre infrarouge (IR) caractéristique (Ng et Obbard, 2006 ; Frias *et al.*, 2010 ; Harrison *et al.*, 2012 ; Vianello *et al.*, 2013). Les spectroscopies FTIR et Raman sont des techniques complémentaires. Les vibrations moléculaires inactives en Raman sont actives en IR et *vice versa*. Elles peuvent ainsi fournir des informations complémentaires sur les particules ciblées (Käppler *et al.*, 2016). La spectroscopie FTIR repose sur un rayonnement IR qui excite les vibrations moléculaires au moment du contact avec la particule analysée. Or, ces vibrations dépendent de la longueur d'onde et sont spécifiques à la composition de la structure moléculaire de la particule. Ainsi, l'énergie du rayonnement IR qui excite une vibration spécifique sera, en fonction de la longueur d'onde, absorbée dans une certaine mesure, ce qui permet de mesurer les spectres IR caractéristiques de la substance analysée. Les polymères plastiques possèdent notamment des spectres IR très spécifiques (**Figure 15**B) avec des profils bien distincts, ce qui fait de la spectroscopie IR une technique optimale pour l'identification des MP (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Par ailleurs, la spectroscopie FTIR peut, en plus, fournir de plus amples informations sur l'altération physico-chimique des particules de plastique en détectant l'intensité de l'oxydation (Corcoran *et al.*,

2009). Concernant la résolution spatiale, celle-ci est plus restreinte que la spectroscopie Raman puisqu'elle est limitée à 10 µm (Ribeiro-Claro *et al.*, 2017). L'autre limite de cette approche est la difficulté de la mesure IR des particules noires en raison de leur forte absorption IR (Löder et Gerdts, 2015).

5.5. Contamination des échantillons *in situ*

En raison de leur omniprésence, la contamination des échantillons environnementaux par des MP qui n'y sont pas initialement présents est l'un des principaux problèmes rencontrés dans l'évaluation de la contamination environnementale (Rocha-Santos et Duarte, 2015). En effet, l'ensemble des processus d'échantillonnage, de traitement et d'identification sont autant d'étapes où l'introduction de MP par inadvertance peut intervervenir. Par conséquent, ce phénomène peut conduire à une sur-estimation de l'abondance en MP dans les échantillons (Löder et Gerdts, 2015). Ainsi, les sources potentielles doivent être identifiées et plusieurs précautions pour s'en prémunir doivent être respectées afin de limiter cette contamination. Ces MP (principalement des microfibres) peuvent être introduits dans les échantillons *via* l'air ambiant (*e.g.* filtres des climatisations) (Wesch *et al.*, 2017), mais aussi *via* l'utilisation de solutions et/ou d'équipements de laboratoire contaminés, de stockage inapproprié des échantillons ou même provenir des vêtements synthétiques des manipulateurs (Lusher *et al.*, 2017b). Pour limiter et atténuer ces risques de contamination, les équipements en plastique sont évités autant que possible et sont nettoyés systématiquement avant leur utilisation, les échantillons sont conservés dans des récipients en verre et fermés, et le port de vêtement non-synthétique (*e.g.* coton) est recommandé (Woodall *et al.*, 2015). En complément de ces mesures, des contrôles/blancs peuvent être réalisés et servir de témoins de la contamination ambiante sur le lieu d'échantillonnage mais également en laboratoire. Pour se faire, un récipient en verre est rempli d'eau distillée filtrée (de préférence) et laissé ouvert sur le site d'étude au moment de l'échantillonnage et/ou dans l'environnement de laboratoire lors du traitement des échantillons. Dès que les échantillons *in situ* sont refermés, les échantillons témoins le sont également. Les particules/fibres strictement identiques (*i.e.* nature du polymère, forme, couleur, etc) aux échantillons témoins et *in situ* ne sont généralement pas retenues dans l'évaluation de la contamination en MP ou bien jugées négligeables en cas de faible abondance. Woodall *et al.* (2015) ont démontré que l'abondance des microfibres contaminantes dans des échantillons de sédiment pouvait être réduite de 90% en mettant en place ces pratiques rigoureuses pour échantillonner, extraire et caractériser les MP. Ainsi, ces approches permettent de garantir un minimum de contamination post-échantillonnage et une meilleure appréciation de la contamination environnementale.

5.6. Concentrations en microplastiques dans les matrices environnementales

La présence de MP a été rapportée dans tous les compartiments environnementaux. Les études à ce sujet couvrent les principaux océans comprenant l'océan Pacifique (Eriksen *et al.*, 2013 ; Desforges *et al.*, 2014), l'océan Atlantique (Ivar do Sul *et al.*, 2013 ; Kanhai *et al.*, 2017), l'océan Indien (Imhof *et al.*, 2017), ainsi que l'océan Arctique (Lusher *et al.*, 2015 ; Cózar *et al.*, 2017) et Antarctique (Munari *et al.*, 2017 ; Suaria *et al.*, 2020), en passant par la mer Méditerranée (Collignon *et al.*, 2012 ; de Haan *et al.*, 2019) et la mer du Nord (Dubaish et Liebezeit, 2013 ; Tamminga *et al.*, 2018). Ils ont été recencés partout, depuis les côtes peuplées (Isobe *et al.*, 2015 ; Frère *et al.*, 2017 ; Di Mauro *et al.*, 2017 ; Abayomi *et al.*, 2017) jusqu'aux territoires les plus reculés (Obbard, 2018 ; Peeken *et al.*, 2018) ; allant des eaux de surface (Eriksen *et al.*, 2013 ; Lusher *et al.*, 2015) aux sédiments (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013 ; Woodall *et al.*, 2014) en passant par la colonne d'eau (Lattin *et al.*, 2004), jusqu'aux organismes marins (Murray et Cowie, 2011 ; Foekema *et al.*, 2013 ; Cole *et al.*, 2015b). Les résultats de certaines études sont recensés dans les **Tableaux 2**, **3** et **4** concernant la contamination en MP dans l'eau de mer, les sédiments et les organismes marins, respectivement. Il est cependant important de noter que la comparaison des travaux réalisés sur le terrain est souvent difficile en raison de l'absence de standardisation des méthodes d'échantillonnage, des unités de normalisation et de l'expression des données (*i.e.* définition, taille, caractérisation des MP décrits ; Ryan *et al.*, 2009). Par exemple, pour l'eau et les sédiments, les unités régulièrement utilisées dans la littérature sont rapportées en nombre de particules (p) ou en masse (g) de particules par unité de surface (p/m^2 ; g/m^2), par unité de volume (p/m^3 ; g/m^3) ou par unité de masse (p/kg ; g/kg) d'échantillon. Pour le biote, l'abondance de particules est généralement rapportée en particules par individu (p/ind.), par organe (*e.g.* p/estomac, p/intestin) ou en masse de particules par unité de masse d'échantillon (*e.g.* g/kg) (Peng *et al.*, 2020). La notion de « particules » et « particules plastiques » est également importante à prendre en compte car ces deux termes font souvent l'objet d'amalgames dans la littérature (notamment dans les études moins récentes). Ainsi, dans cette section le terme « particules (p) » sera utilisé quand celles-ci n'ont pas été identifiées et confirmées par spectroscopie comme étant du plastique, ou « MP » le cas échéant.

5.6.1. Contamination des eaux

L'abondance et la distribution des MP dans les océans sont étroitement liées à la démographie et au niveau d'activités anthropiques (Li *et al.*, 2018). En Corée du Sud par exemple, les échantillons d'eau de mer prélevés en surface et dans la colonne d'eau ont atteint en moyenne 1051 MP/m^3 dans les zones ubaines côtières contre 560 MP/m^3 en provenance des zones rurales (Song *et al.*, 2018). Cependant, les facteurs environnementaux peuvent également jouer un rôle important dans la distribution et l'abondance des MP (Zhang *et al.*, 2017 ; Herrera

et al., 2018). Comme évoqué précédemment, ces facteurs environnementaux comprennent les courants, les vagues (Kim *et al.*, 2015), les marées, les cyclones, les vents (Browne *et al.*, 2010 ; Kukulka *et al.*, 2012 ; Thiel *et al.*, 2013 ; Sadri et Thompson, 2014 ; Liubartseva *et al.*, 2016) et l'hydrodynamisme fluvial (Besseling *et al.*, 2017). Ainsi, certaines régions proches de pays fortement urbanisés et industrialisés peuvent présenter des concentrations en MP très variables dans les eaux de surface (640-42000 MP/km^2) dépendantes de l'action des courants (Pan *et al.*, 2019) et parfois inférieures à celles rencontrées dans certaines régions insulaires (Péninsule Antarctique : 755-3524 MP/km^2 ; Lacerda *et al.*, 2019). Aussi, comme pour les (macro-)déchets de plastiques, les rivières et les fleuves sont des vecteurs importants dans le transport de MP vers les océans (Klein *et al.*, 2015 ; Lebreton *et al.*, 2017). Par exemple, près de deux milliards de MP seraient entrés dans les eaux côtières californiennes en un peu plus de trois jours par l'intermédiaire de deux fleuves (Moore *et al.*, 2011). Plus impressionnant, selon une estimation, près de 4,2 tonnes de plastique rentreraient dans la mer Noire *via* le Danube chaque jour (~ 7.5 mg/m^3/s ; Lechner *et al.*, 2014). Cependant, les auteurs de cette dernière étude emploient le terme « plastique » à tort car la caractérisation des particules n'a pas été réalisée. Par ailleurs, l'abondance de MP est également plus importante durant les saisons des pluies que pendant les saisons sèches. Les concentrations en MP dans la rivère Nakdong (Corée du Sud), sont passées de 260-1410 MP/m^3 en saison sèche à 210-15560 MP/m^3 en saison des pluies (Kang *et al.*, 2015). De la même manière, les pressions anthropiques couplées à la géographie peuvent donner naissance à des zones d'accumulation massives. C'est le cas de la mer Méditerrannée, qui est un environnement semi-fermé recevant de grandes quantités de MP des pays alentours, pouvant atteindre des concentrations de l'ordre de 244 000 p/km^2 (Collignon *et al.*, 2012). Un autre aspect important de la pollution en MP pourrait être l'augmentation rapide des concentrations *in situ*. Par exemple, une très faible abondance de particules de 6,06 × 10^{-5} - 8,32 × 10^{-3} p/m^3 a été signalée dans des échantillons d'eau de la région côtière entre Cape Cod et les Caraïbes dans l'océan Atlantique en 1974 (Colton *et al.*, 1974). Bien que la zone et la méthode employée n'étaient pas rigoureusement les mêmes (primordial pour un suivi temporel), l'abondance a atteint 5,0 à 18,4 MP/m^3 dans les échantillons d'eau de la côte voisine de la Louisiane (États-Unis) 43 ans plus tard (Di Mauro *et al.*, 2017).

Tableau 2. Concentrations en microplastiques dans l'eau de mer à travers le monde (études récentes depuis 2012). *Modifié d'après Xu et al. (2020) – Science of The Total Environment.*

Location	Marine environment	Concentration	Unit	Reference
Northwestern Pacific Ocean	Surface water	640-42,000	MP/km^2	Pan *et al.*, 2019
Arabian Bay	Surface water	4.38 × 10^4-1.46 × 10^6	MP/km^2	Abayomi *et al.*, 2017
Mediterranean	Surface water	0-9.0 × 10^5	particles/km^2	Collignon *et al.*, 2012
Coast of South Korea	Surface water	1051	MP/m^3	Song *et al.*, 2018
South and southwest of Svalbard, Norway	Surface water	0-1.31	MP/m^3	Lusher *et al.*, 2015
South and southwest of Svalbard, Norway	Sub-surface	0-11.5	MP/m^3	Lusher *et al.*, 2015
Northeast Greenland	Sub-surface	1-3	MP/m^3	Morgana *et al.*, 2018
Antarctic Peninsula	Surface water	755-3524	MP/km^2	Lacerda *et al.*, 2019
Southern North Sea	Surface water	0.1-245.4	MP/m^3	Lorenz *et al.*, 2019

Northeast Atlantic Ocean	Sub-surface	2.46	particles/m^3	Lusher *et al.*, 2014
Coastline of Bandar Abbas	Surface water	3252	MP/m^2	Nabizadeh *et al.*, 2019
Jiaozhou Bay, China	Surface water	20-120	MP/m^3	Zheng *et al.*, 2019
Bohai Bay, China	Surface water	650.0-2700.0 and 540.0-1550.0	MP/m^3	N. Wu *et al.*, 2019
Banderas Bay, Mexico	Surface water	0.013-0.044	MP/m^3	Pelamatti *et al.*, 2019
Chabahar Bay, Gulf of Oman (Makran Coasts)	Surface water	0.07-1.14	MP/m^3	Aliabad *et al.*, 2019
Kingston Harbour, Jamaica	Surface water	0-5.73	MP/m^3	Rose and Webber, 2019
Ross Sea (Antarctica)	Surface water	0.0032-1.18	MP/m^3	Cincinelli *et al.*, 2017
Northern Gulf of Mexico	Surface water	4.8-18.4	MP/m^3	Di Mauro *et al.*, 2017
North Atlantic Ocean, Scotland	Deep-sea water	70.8	MP/m^3	Courtene-Jones *et al.*, 2017
Jinhae Bay, South Korea	Surface water	88	MP/L	Song *et al.*, 2015b
South-eastern coastline of South Africa	Surface water	257.9-1215	particles/m^3	Nel and Froneman, 2015
Slovenian part of the Northern Adriatic	Surface water	406×10^3	MP/km^2	Gajšt *et al.*, 2016
Israeli Mediterranean coastal waters	Surface water	7.68	MP/m^3	van der Hal *et al.*, 2017
Bohai Sea, China	Surface water	0.33	MP/m^3	Zhang *et al.*, 2017

5.6.2. Contamination des sédiments

Les sédiments sont la destination finale des MP dans l'environnement (Woodall *et al.*, 2014). Une étude récente a pu mettre en évidence des corrélations positives entre les MP présents dans l'eau et les sédiments de la même zone (Zheng *et al.*, 2019). Les concentrations en MP rencontrées dans les sédiments sont d'ailleurs souvent plus importantes que celles rencontrées dans l'eau environnante (Song *et al.*, 2019). Néanmoins, l'accumulation des MP dans les sédiments peut être influencée par la formation d'aggrégats, la profondeur du sédiment, la distance du rivage et le débit d'eau des rivières. Par exemple, dans la mer de Maowei (Chine), la concentration en MP dans les sédiments de l'estuaire (520-940 MP/kg ps) est beaucoup plus faible qu'à l'entrée de la zone océanique (1780-2310 MP/kg ps) (Li *et al.*, 2019). Les auteurs de cette étude suggèrent que les débits d'eau plus faibles à l'entrée de cette zone accélèrent le dépôt de MP de l'eau vers les sédiments (Li *et al.*, 2019). Il a également été démontré que l'abondance des MP près du littoral (210-240 MP/kg ps) peut être beaucoup plus élevée que dans les eaux plus éloignées de la côte (60-90 MP/kg ps) (B. Zhang *et al.*, 2019). Par ailleurs, Wang *et al.* (2019) ont mis en évidence une corrélation positive entre la profondeur d'échantillonnage et l'abondance des MP dans les sédiments de la Mer Jaune (Chine). Dans cette étude, des échantillons de sédiment ont été prélevés à < 20, 20-40, 40-60 et 60-80 mètres de profondeur et les concentrations obtenues ont respectivement atteint 1765, 2135, 2347 et 2771 MP/kg ps, indiquant une plus grande accumulation des MP dans les sédiments plus profonds. Des concentrations très importantes ont également été mises en évidence par Van Cauwenberghe *et al.* (2013) dans des sédiments recueillis entre 1100 et 5000 m de profondeur dans l'océan Atlantique et la mer Méditerranée. Les auteurs révèlent que les MP sous forme de fibres peuvent être quatre fois plus importants dans les sédiments d'eau profonde que dans les eaux de surface contaminées (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013). Ces résultats sont confirmés par Woodall *et al.* (2014) dans des sédiments situés entre 500 et 3500 m de profondeur dans la mer Méditerranée, le sud-ouest de l'océan Indien et le nord-est de l'océan Atlantique. En

moyenne, les échantillons contiendraient 13,4 microfibres pour 50 ml de sédiment (Woodall *et al.*, 2014), démontrant ainsi la présence de grandes zones de dépôt jusqu'ici méconnues (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013).

Tableau 3. Concentrations en microplastiques dans les sédiments marins à travers le monde (études récentes depuis 2012). *Modifié d'après Xu et al. (2020) – Science of The Total Environment.*

Location	Concentration	Unit	Reference
Maowei Sea, China	520-940	MP/kg dw	Li *et al.*, 2019
Northern Bering and Chukchi Seas	< 68.88	MP/kg dw	Mu *et al.*, 2019
South Yellow Sea	1765	MP/kg dw	J. Wang *et al.*, 2019
Yellow Sea and East China Sea	60-240	MP/kg dw	C. Zhang *et al.*, 2019
Southern North Sea	2.8-1188.8	MP/kg dw	Lorenz *et al.*, 2019
Beaches in Mumbai, India	12-960	particles/m^2	Jayasiri *et al.*, 2013
Beaches in Slovenia	133.3-155.6	particles/kg dw	Laglbauer *et al.*, 2014
Norderney, North Sea coast of Germany	2.3	particles/kg dw	Dekiff *et al.*, 2014
Halifax Harbor, Nova Scotia	2000-8000	particles/kg dw	Mathalon and Hill, 2014
Bohai Bay, China	96.7-333.3 and 56.7-113.3	MP/kg dw	N. Wu *et al.*, 2019
Beaches of Tenerife (Canary Islands, Spain)	2-115.5	MP/m^2	Álvarez-Hernández *et al.*, 2019
Beach in the Biosphere Reserve of Lanzarote	36.3	g MP/m^2	Edo *et al.*, 2019
Sishili Bay, North Yellow Sea, China	499.76	MP/kg dw	B. Zhang *et al.*, 2019
Northwestern Mediterranean Sea	33-798 and 12-187	MP/kg dw	Constant *et al.*, 2019
Beaches in eastern waters of Hong Kong	0.58-2116	MP/kg dw	Lo *et al.*, 2018
South-eastern coastline of South Africa	688.9-3308	particles/m^2	Nel and Froneman, 2015
Huatulco Bay, Pacific coast of southernMexico	1600-2300	particles/kg dw	Retama *et al.*, 2016
Northern Gulf of Mexico estuaries	2-117	MP/m^2	Wessel *et al.*, 2016
Mediterranean Sea, Spain	100.78-897.35	particles/kg dw	Alomar *et al.*, 2016
Beaches of Kaliningrad region, Russia	1.3-36.3	particles/kg dw	Esiukova, 2017
Coasts of Tyrrhenian Sea, Italy	42-1069	particles/kg dw	Cannas *et al.*, 2017
Baltic Sea, Russia	34	particles/kg dw	Zobkov and Esiukova, 2017
Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica)	1-90	particles/m^2	Munari *et al.*, 2017
Strait of Hormuz, Persian Gulf	2-1258	MP/kg dw	Naji *et al.*, 2017a
Persian Gulf, Iran	61	MP/kg dw	Naji *et al.*, 2017b

5.6.3. Contamination des organismes marins

Les MP ont été détectés dans une grande variété d'organismes marins appartenant aux premiers maillons du réseau trophique jusqu'aux grands prédateurs (Lusher, 2015). En effet, plusieurs études rapportent leur présence dans le tractus digestif de consommateurs primaires tels que les organismes suspensivores. Les bivalves comme les moules (*e.g. Mytilus edulis*) ou les huîtres (*e.g. Crassostrea gigas*) ont fait l'objet d'une grande attention en raison de leur importance sanitaire à l'égard de leur portée commerciale et alimentaire (Mathalon et Hill, 2014 ; Van Cauwenberghe et Janssen, 2014 ; J. Li *et al.*, 2015, 2016 ; Leslie *et al.*, 2017 ; Phuong *et al.*, 2018 ; X. Qu *et al.*, 2018). Des MP ont également été signalés chez des organismes détritivores et déposivores tels que le crabe *Carcinus maenas* (Leslie *et al.*, 2017), la crevette *Crangon crangon* (Devriese *et al.*, 2015), la langoustine *Nephrops norvegicus* (Murray et Cowie, 2011) ou encore le bigorneau *Littorina Littorea* (Leslie *et al.*, 2017). Les consommateurs secondaires tels que les téléostéens pélagiques, démersaux et abyssaux ne sont pas épargnés par cette contamination qui peut se faire indirectement le long de la chaîne alimentaire (Anastasopoulou *et al.*, 2013 ; Lusher *et al.*, 2013 ; Romeo *et al.*, 2015 ; Bellas *et al.*, 2016 ; Murphy *et al.*, 2017 ; Bessa *et al.*, 2018). Les céphalopodes (Braid *et al.*, 2012), les tortues (Caron

et al., 2018), les mammifères (Nelms *et al.*, 2019) et les oiseaux marins (Terepocki *et al.*, 2017) sont également contaminés. Cette contamination et l'abondance des MP dans les organismes varient selon les espèces, leur mode d'alimentation, les lieux, les méthodes d'échantillonnage, ainsi que les méthodes d'analyse (Peng *et al.*, 2020). Par exemple sur les côtes chinoises, J. Li *et al.* (2016) ont démontré que la contamination en MP chez la moule (*M. edulis*) sauvage (2,7 MP/g) est plus importante que celle issue de l'aquaculture (1,6 MP/g). Pourtant, des observations contraires sont constatées chez la même espèce sur les côtes européennes (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014) mais également en province canadienne (Terre-Neuve) avec des individus d'élevage (~ 75 p/ind.) davantage contaminés que des individus sauvages (~ 34 p/ind.) (Mathalon et Hill, 2014). Néanmoins, dans cette dernière étude, les particules n'ont pas été identifiées et les échantillons témoins ont révélé une contamination de l'air importante dans le laboratoire d'analyse ; pouvant contribuer à près de 25 p/g de tissu (Mathalon et Hill, 2014). Ces études démontrent que l'évaluation de la contamination en MP dans le biote est soumise à de nombreux facteurs qui peuvent influencer les résultats des travaux. Par ailleurs, l'omniprésence des MP au sein des organismes est une évidence au regard de la littérature et leurs impacts potentiels sur la vie marine demeurent mal connus.

Tableau 4. Concentrations en microplastiques dans les organismes marins à travers le monde (études récentes depuis 2013). *Modifié d'après Rezania et al. (2018) – Marine Pollution Bulletin.*

Location	Microorganism	Accumulation part	Unit	Reference
English Channel	Pelagic and demersal fish	Gastrointestinal tracts	1.90 ± 0.10 particles/ind.	Lusher *et al.*, 2013
Mussel farm in Germany	Two bivalves species: *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*	Gut	In mussels 0.36 ± 0.07 and oysters 0.47 ± 0.16 MP/g (ww)	Van Cauwenberghe and Janssen, 2014
Halifax Harbor, Nova Scotia	Wild and farmed blue mussels (*Mytilus edulis*)	Digestive tract	170 and 375 particles per wild and farmed mussel	Mathalon and Hill, 2014
Northern Ireland	Adult whales	Digestive tract	2.95 MP/ind.	Lusher, 2015
China	Bivalves	Soft tissue	4.3 to 57.2 MP/ind.	Li *et al.*, 2015
Adriatic Sea, Italy	Adriatic fish mullet	Gastrointestinal tracts	1 to 1.78 MP/ind.	Avio *et al.*, 2015b
Mediterranean Sea	Large pelagic fish (*Xiphias gladius*, *Thunnus thynnus* and *Thunnus alalunga*)	Stomach	4 to 16 particles/ind.	Romeo *et al.*, 2015
Spanish Atlantic and Mediterranean coasts	Demersal fish	Stomach	1.56 ± 0.5 particles/ind.	Bellas *et al.*, 2016
North and Baltic Sea	Pelagic and demersal fish	Gut	0.03 ± 0.18 MP/ind.	Rummel *et al.*, 2016
Dutch river delta and Amsterdam canals	Common shore crab (*Carcinus maenas*); sand hopper (*Gammarus spp.*); periwinkle (*Littorina littorea*); blue mussel (*Mytilus edulis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*).	Digestive gland	11 to 105 MP/ g dw	Leslie *et al.*, 2017
Pacific and Grays Harbor counties, Washington	Northern Fulmars (*Fulmarus glacialis*) and Sooty Shearwaters (*Ardenna grisea*)	Gastrointestinal tracts	13.3 and 19.5 particles/ind. for fulmar and shearwaters, respectively.	Terepocki *et al.*, 2017
French Atlantic coast	Blue mussel (*Mytilus edulis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)	Soft tissues	0.61 ± 0.56 and 2.10 ± 1.71 MP/ind. for mussel and oyster, respectively	Phuong *et al.*, 2018
Persian Gulf	Five littoral mollusk species	Whole body	0.2 to 21 MP/g ww	Naji *et al.*, 2018
Coastal waters of China	Mussels (*Mytilus edulis*, *Perna viridis*)	Whole body	1.52 to 5.36 MP/g ww	Qu *et al.*, 2018
Mondego estuary in Portugal	Commercial fish	Gastrointestinal tract	1.67 ± 0.27 MP/ind.	Bessa *et al.*, 2018
Northeast of Persian Gulf, Iran	Benthic and pelagic fish species	Fish muscles	5.66 to 18.5 MP/10 g fish muscle	Akhbarizadeh *et al.*, 2018

6. Impacts des micro- et nanoplastiques sur les organismes aquatiques en conditions contrôlées de laboratoire

Depuis quelques années maintenant, la communauté scientifique s'intéresse aux effets (éco)toxicologiques que peuvent occasioner les MP sur les organismes aquatiques. Cependant, ce travail est difficile *in situ* pour distinguer les éventuels effets induits par les MP de ceux causés par d'autres facteurs de stress (*e.g.* réchauffement climatique, acidification des océans, polluants organiques persistants). À cet égard, de nombreuses études ont été menées dans des conditions controlées de laboratoire afin de mieux caractériser et prédire le risque potentiel que représentent les MP pour la faune et la flore. À mesure que l'abondance des MP dans l'environnement augmente, leur bio-disponibilité pour les organismes augmente également. Cette bio-disponibilité et l'apparition des MP dans le réseau trophique sont considérablement influencées par certaines caractéristiques comme la taille, la densité, la forme, la couleur, la charge, l'agrégation et l'abondance des MP, ce qui explique toute la complexité d'effectuer des études réalistes (Wright *et al.*, 2013b ; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015b). Pour ces raisons, l'impact des nanoplastiques (NP) sera également abordé dans cette section. En effet, bien que leur suivi environnemental ne soit pas encore possible, les concentrations *in situ* en NP sont attendues à des niveaux bien supérieurs à ceux des MP (Erni-Cassola *et al.*, 2017 ; Wagner et Reemtsma, 2019). Par conséquent, la communauté scientifique s'intéresse depuis quelques années maintenant aux risques liés aux NP. Les conclusions de ces études toxicologiques font état d'une toxicité plus importante des NP en comparaison à celle induite par les MP (Jeong *et al.*, 2016 ; Stapleton, 2019 ; Kögel *et al.*, 2020). En effet, à cause de leurs propriétés qui diffèrent de celles des MP (*e.g.* augmentation du ratio surface/volume), les NP sont capables de passer à travers les membranes biologiques. Ils présentent donc un potentiel d'interaction avec les macromolécules plus important que les MP, ce qui augmente les risques de lésions et les dommages provoqués chez les organismes exposés (Mattsson *et al.*, 2015 ; Wright et Kelly, 2017). Ainsi, de par leurs caractéristiques et leur ominiprésence (suspectée pour les MNP < 10 µm) au sein des écosystèmes pélagiques et benthiques, les micro- et nanoplastiques (MNP) sont susceptibles d'être ingérés par de nombreux organismes. Une fois ingérés, les MNP peuvent causer des dommages physiques et chimiques au niveau individuel, cellulaire et moléculaire altérant les fonctions physiologiques des animaux jusqu'aux effets létaux (**Figure 16**).

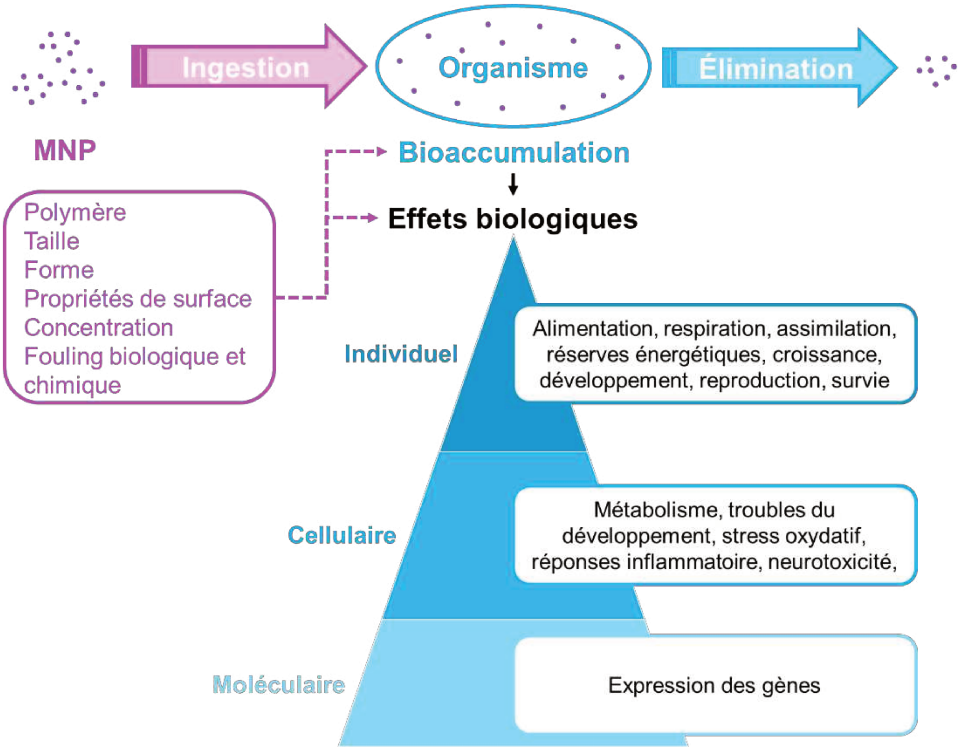


Figure 16. Schéma illustrant les effets biologiques que peut occasionner l'ingestion de micro- et nanoplastiques (MNP) à différentes échelles de l'organisme. Ces effets sont influencés par le devenir des MNP une fois ingérés (*i.e.* simple transit avant élimination ou bioaccumulation) qui dépend de leurs propriétés physico-chimiques.

6.1. Ingestion et devenir des micro- et nanoplastiques dans l'organisme

Les effets néfastes induits par les MNP sur l'organisme contaminé peuvent survenir consécutivement post-ingestion à travers (i) un simple transit dans le tractus digestif provoquant divers dommages physiques et/ou chimiques, et pouvant perturber les flux métaboliques de l'individu, effets qui peuvent s'aggraver dans le cas d'une (ii) accumulation des particules dans le tractus digestif, amplifiant les effets physiques (*e.g.* obstruction) et chimiques ; (iii) une translocation des particules dans des tissus adjacents au tractus digestif de l'animal induisant diverses lésions tissulaires et cellulaires et projettant des effets sur d'autres organes et leurs fonctions biologiques.

6.1.1. Ingestion et accumulation

L'ingestion et le devenir des MNP dans l'organisme sont déterminés en partie par les propriétés physico-chimiques (*e.g.* taille, forme, charge) des particules. En général, les plus petits MP et les NP sont beaucoup plus faciles à ingérer. Par exemple, le copépode *Acartia clausi* est capable d'absorber des quantités considérables de MP (microbilles de polystyrène, micro-PS)

de 7,3 µm mais nettement moins concernant les micro-PS de 20,6 et 30,6 µm (Cole *et al.*, 2013). Chez l'huître creuse (*C. gigas*), les larves sont capables d'ingérer des micro-PS de 0,16-7,3 µm à tout âge tandis que ceux de 20,3 µm sont seulement ingérés par les larves âgées de 24 jours post-fécondation (**Figure 17** ; Cole et Galloway, 2015). Globalement, ces travaux témoignent de la bio-disponibilité des particules plastiques qui augmente au fur et à mesure que leur taille diminue soulignant ainsi leur potentiel d'ingestion par des espèces planctoniques, à la base de la chaîne alimentaire. Ainsi, l'ingestion des MNP peut également se faire indirectement par transfert trophique, d'un niveau inférieur vers un niveau supérieur (Wright *et al.*, 2013b). Ce transfert a été mis en évidence en conditions de laboratoire *via* l'utilisation de micro-PS fluorescentes de 10 µm. En effet, les micro-PS préalablement ingérés par le zooplancton, *Eurytemora affinis*, ont été retrouvés dans l'intestin de mysis, *Neomysis integer* (Setälä *et al.*, 2014).

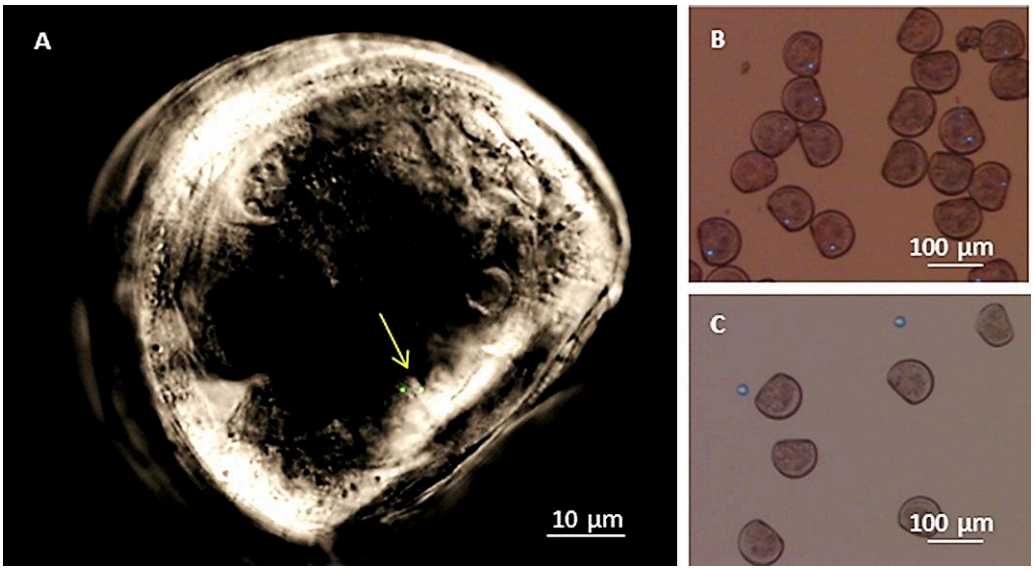


Figure 17. Photographies illustrant l'ingestion de nano- et microplastiques fluorescents variant selon la taille des particules chez des larves d'huîtres (*Crassostrea gigas*) agées de 3 jours (post-fécondation). (**A**) larve d'huître après ingestion de nanobilles de 160 nm (flèche jaune) ; (**B**) microbilles de 1,84 µm ingérées par environ 20% des larves de *C. gigas* ; (**C**) larves n'ayant pu ingérer les microbilles de 20,3 µm. *D'après Cole et Galloway (2015) – Environmental Science & Technology*.

Une fois ingérés, les MNP peuvent simplement transiter (avant élimination) ou bien s'accumuler dans le système digestif de l'organisme. L'accumulation de particules plastiques (et/ou leur situation transitoire considérant une ingestion permanente) a été décrite dans l'intestin, le tube digestif et l'estomac de plusieurs espèces telles que la moule *M. edulis* (Kolandhasamy *et al.*, 2018) et le poisson *Platycephalus indicus* (Abbasi *et al.*, 2018). Cette accumulation des MNP est encore une fois largement dépendante de la taille des particules.

Après une exposition de 48 h à des microfibres de PET (62-1400 µm), la majorité des microfibres retrouvées dans l'intestin de *Daphnia magna* avaient une taille d'environ 300 µm (Jemec *et al.*, 2016). En plus de la taille, la forme des MNP influence également leur temps de rétention et leur potentiel d'accumulation. Par exemple, la forme sphérique et lisse des micro- et nanobilles standardisées régulièrement utilisées pour les expérimentations *in vivo*, facilite le transit à l'intérieur du système digestif de l'organisme contrairement aux fragments de formes irrégulières (Mazurais *et al.*, 2015 ; Frydkjær *et al.*, 2017 ; Paul-Pont *et al.*, 2018).

6.1.2. Translocation

Les MNP s'accumulent généralement dans le tractus digestif de l'animal mais peuvent aussi se transloquer dans d'autres tissus et/ou organes à travers les épithéliums, et ce, de façon très dépendante de la taille ; la translocation étant avérée pour les NP voire les tous petits MP (revue dans Paul-Pont *et al.*, 2018). En effet, des études ont démontré que les MP ingérés par la moule, *M. edulis*, étaient susceptibles d'être absorbés par les cellules épithéliales du tractus intestinal puis transférés dans le système circulatoire (Browne *et al.*, 2008 ; von Moos *et al.*, 2012). Ce transfert a pu être démontré grâce à l'identification de micro-PS fluorescentes (3 et 9,6 µm) dans la cavité intestinale et la glande digestive puis dans l'hémolymphe de la moule après 3 jours d'exposition. Ces microbilles étaient encore observables dans le système circulatoire 48 jours post-exposition (Browne *et al.*, 2008). Néanmoins, ces résultats de translocation de MP chez la moule (*i.e.* un bivalve à système circulatoire non-clos) sont à nuancer car une contamination induite par la cavité inter-valvaire (zone remplie du milieu d'exposition) est possible (Paul-Pont *et al.*, 2018). L'accumulation de MNP dans les gonades, le manteau, le muscle adducteur, les viscères et le pied de la moule a également été rapportée (microfibres de 0,05-5 mm ; Kolandhasamy *et al.*, 2018) ainsi que dans l'estomac, l'hépatopancréas, l'ovaire et les branchies du crabe, *Carcinus maenas* (micro-PS fluorescentes de 0,5 µm ; Farrell et Nelson, 2013). Cependant, ces phénomènes d'accumulation ne sont pas systématiquement le résultat d'un transfert des particules du tractus digestif vers les tissus adjacents. En effet, il est important de noter que les MNP ont également la capacité de se fixer/d'adhérer à la surface de certains organes qui ne sont pas impliqués dans le système digestif (*e.g.* tégument, branchies, pieds, manteau) (Kolandhasamy *et al.*, 2018 ; Abbasi *et al.*, 2018) et peuvent ainsi pénétrer l'organisme. Ces phénomènes de translocation sont rendus possible par endocytose, phagocytose et pinocytose (Gustafson *et al.*, 2015 ; Noventa *et al.*, 2018) mais peuvent également résulter de biais manipulatoires au moment du prélèvement et/ou préparation des échantillons comme précédemment ennoncé (*e.g.* contaminations diverses au moment des dissections, préparation des blocs pour analyse histologique) (Paul-Pont *et al.*, 2018). Ces aspects sont encore très discutés et controversés au sein de la communauté scientifique mais elle s'accorde à dire que la translocation reste largement dépendante de la taille et de la charge des particules (Galloway

et al., 2017 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). Par exemple, Jeong *et al.* (2018) ont signalé la présence de nanobilles de PS (nano-PS) de 0,05 µm dans divers organes chez le rotifère *Brachionus plicatilis* post-exposition tandis que les micro-PS de 0,5-6 µm ont uniquement été localisées dans son tube digestif (**Figure 18**). Par ailleurs, le revêtement (*e.g.* la charge) des particules en surface semble être un facteur encore plus influant dans leur distribution au sein de l'organisme. En effet, après avoir exposé des embryons d'oursin (*Paracentrotus lividus*) à des nano-PS présentant un revêtement carboxylé (NP-COOH, charge négative) ou aminé (NP-NH_2, charge positive), Della Torre *et al.* (2014) ont démontré que la présence des NP-COOH de 40 nm était limitée au tube digestif tandis que les NP- NH_2 de taille plus importante (50 nm) étaient présents dans tous les tissus des embryons. En effet, les interactions membranaires sont facilitées pour les particules chargées positivement en raison des processus d'attraction avec les résidus membranaires chargés négativement (Cho *et al.*, 2009).

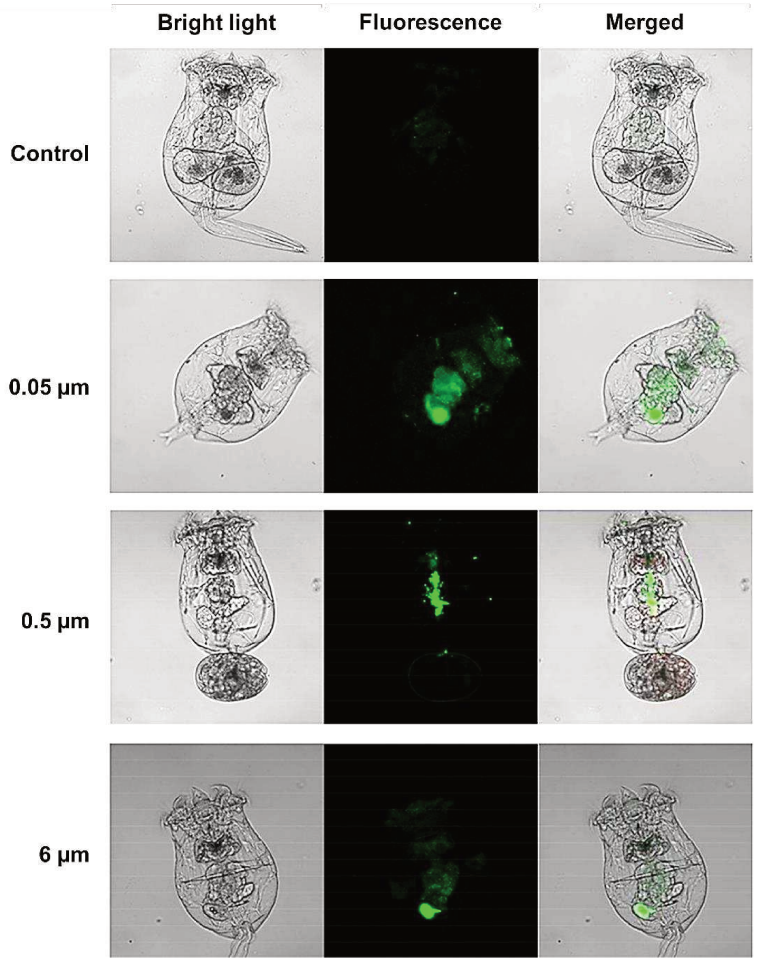


Figure 18. Photographies du rotifère *Brachionus plicatilis* après l'ingestion de nano- et microbilles de polystyrène fluorescentes de 0,05 ; 0,5 et 6 µm. La fluorescence des microbilles de 0,5 et 6 µm a été observée dans le tractus digestif de l'animal tandis que les microbilles de 0,05 µm se sont dispersées dans les organes adjacents, indiquant que les membranes sont possiblement perméables aux microbilles de 0,05 µm et peuvent s'accumuler dans le rotifère. *D'après Jeong et al. (2018) – Environmental Science & Technology.*

Une étude plus récente a également mis en évidence l'influence de la taille des particules dans les phénomènes de translocation par le biais d'une approche méthodologique innovante basée sur la traçabilité mais surtout la quantification de nano-PS (24 et 250 nm) radio-marquées au ^{14}C (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018). En effet, en réalisant des coupes transversales *in toto* de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) préalablement exposées aux NP-^{14}C (< 15 µg.L^{-1}), les auteurs ont pu mesurer leur abondance dans les tissus après avoir exposé les coupes à des écrans phosphostimulables. L'intensité de la radioluminescence émise et mesurée par autoradiographie a ainsi permis d'obtenir la distribution et l'abondance des NP-^{14}C dans les tissus de *P. maximus* et leur potentiel de dépuration (allant de 6 h à 48 jours) selon la taille des particules (**Figure 19**). Les résultats de ces travaux ont mis en évidence une accumulation des NP-^{14}C 250 nm dans l'intestin, tandis que les NP-^{14}C 250 nm 24 nm étaient dispersées dans tous les tissus (**Figure 19**A-B), indiquant peut-être une translocation à travers les membranes épithéliales. Cependant, la dépuration a été plus rapide pour les NP-^{14}C 24 nm, qui n'étaient plus détectables après 14 jours, que pour les NP-^{14}C 250 nm, qui étaient encore détectables après 8 (**Figure 19**C-D) et 48 jours (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018). Ces résultats dénotent une certaine complexité des mécanismes impliqués dans la biocinétique des particules au sein de l'organisme exposé (notamment leur élimination) ; mais soulignent l'importance de considérer leur taille et surtout l'intérêt d'effectuer des expositions chroniques.

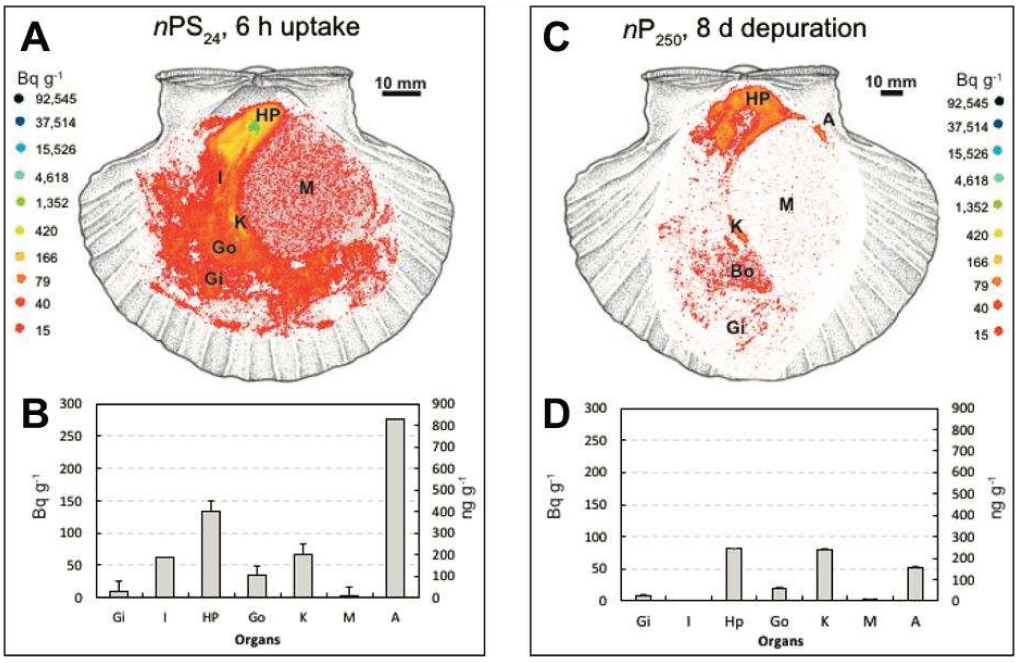


Figure 19. Ingestion et dépuration de nanobilles de polystyrène 24 et 250 nm radiomarquées au C^{14} chez la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*). Distribution tissulaire des NP-C^{14} illustrée par autoradiographie quantitative *in toto* et quantification des niveaux de radioactivité mesurés dans chaque tissu après 6 h d'ingestion de NP-C^{14} 24 nm (**A-B**) et après 8 jours de dépuration des NP-C^{14} 250 nm (**C-D**). HP : hépatopancréas, Gi : branchies, Go : gonade, I : intestin, K : rein, M : muscle, A : anus. *D'après Al-Sid-Cheikh et al. (2018) – Environmental Science & Technology.*

6.1.3. Élimination

L'élimination des MNP est une stratégie adoptée par de nombreux organismes aquatiques pour minimiser les effets biologiques potentiels qu'ils peuvent induire. Chez la moule *Perna perna*, les concentrations en MP dans les tissus d'individus sauvages ou issus d'élevage ont diminué respectivement de 47% et 29% après 93 h de dépuration (Birnstiel *et al.*, 2019). Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée à des MP de formes irrégulières (HDPE, ≤ 22 µm), ~ 85% des MP ont été éliminés après 6 jours de dépuration, dont 70% éliminés dès les 24 premières heures (Fernández et Albentosa, 2019). Les MP restants étaient essentiellement < 6 µm (Fernández and Albentosa, 2019). En effet, le taux de dépuration dépend lui aussi de la taille des particules ; les plus petites ont souvent des temps de rétention plus longs que les plus grosses bien qu'un phénomène contraire ait été observé par Al-Sid-Cheikh *et al.* (2018) entre les NP-C^{14} de 24 et 250 nm. Dans une étude comparative, *D. magna* a pu éliminer rapidement les MP de 1 µm, de sorte que la teneur en particules a diminué de plus de 90% en 240 min, tandis que la dépuration des particules de 20 nm au cours de la même période n'était que de 40% (Rosenkranz *et al.*, 2009). De même, chez le têtard *Xenopus tropicalis*, ~ 78% des MP de 10 µm ingérés ont été éliminés après 1 jour de dépuration, contre seulement 58% des MP de 1 µm ont été éliminés (Hu *et al.*, 2016). Ces résultats mettent en évidence la nécessité de considérer la rétention prolongée des plus petites particules ainsi que leur tranfert potentiel le long de la chaîne trophique (Farrell et Nelson, 2013 ; Setälä *et al.*, 2014) et soulignent l'importance d'étudier leurs effets biologiques.

6.2. Effets biologiques des micro- et nanoplastiques

L'accumulation ou le transit des particules au sein de l'organisme (*e.g.* tractus digestif) mais également par simple contact externe (*e.g.* branchies) peut entraîner diverses perturbations au niveau moléculaire, cellulaire, individuel ou même populationnel et écosystémique (Galloway *et al.*, 2017). Les effets biologiques induits par les MNP ont été étudiés chez plusieurs organismes filtreurs comme les moules (Browne *et al.*, 2008 ; Avio *et al.*, 2015a), les concombres de mer (Graham et Thompson, 2009), les nématodes (Besseling *et al.*, 2013 ; Wright *et al.*, 2013a) et le zooplancton (Cole *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2013). La principale préoccupation liée à l'ingestion de MNP concerne les effets physiques (Wright *et al.*, 2013b) et chimiques (Teuten *et al.*, 2009) qu'ils pourraient entraîner sur les organismes. En effet, en plus de l'impact physique lié à la particule en tant que telle, les MNP jouent le rôle d'un « cheval de Troie » permettant à certains produits chimiques de pénéter dans les tissus des êtres vivants. Ainsi, sans être la voie principale de contamination, l'ingestion de MNP peut être une voie secondaire de contamination à travers la désorption (i) de polluants environnementaux et/ou (ii) d'additifs chimiques dans l'organisme et la chaîne alimentaire (Cole *et al.*, 2011).

6.2.1. Impact physique

i. À l'échelle individuelle

À l'échelle de l'individu, les effets physiques sont les plus apparents suite à l'ingestion de MNP. Les dommages les plus marquants incluent le blocage et la perforation intestinale qui se traduisent par diverses lésions des cellules de l'épithélium (Wright *et al.*, 2013b ; Lei *et al.*, 2018). Sans aller jusqu'à ces effets extrêmes qui provoquent le plus souvent la mort, des altérations tissulaires au niveau digestif (*e.g.* réponses inflammatoires), des branchies et de la glande digestive, ainsi que des phénomènes de nécrose dans d'autres tissus tels que le manteau chez la moule ont été observés (Bråte *et al.*, 2018 ; Faggio *et al.*, 2018). Ces impacts physiques ont des répercussions importantes sur les flux énergétiques qui sont de bons indicateurs du statut physiologique d'un individu exposé à un stress. Ainsi, plusieurs travaux ont étudié la perturbation du métabolisme énergétique en mesurant l'ingestion, la respiration et l'efficacité d'assimilation des organismes exposés aux MNP (Besseling *et al.*, 2013 ; Cole *et al.*, 2013 ; Wright *et al.*, 2013a ; Watts *et al.*, 2015 ; Sussarellu *et al.*, 2016) montrant que le dérèglement d'un seul de ces paramètres physiologiques peut avoir des conséquences importantes sur les fonctions vitales de l'animal.

Le comportement alimentaire est un processus physiologique régulièrement impacté par les MNP. Par exemple, l'ingestion de MP en PVC (~ 130 µm) chez le vers marins, *Arenicola marina*, a entraîné une diminution de son alimentation et par conséquent, une réduction de ces réserves énergétiques (Wright *et al.*, 2013a). De même, l'activité de filtration de la moule, *M. edulis*, a été réduite suite à l'ingestion de nano-PS (30 nm), diminuant ainsi son alimentation (Wegner *et al.*, 2012). À contrario, l'étude de Sussarellu *et al.* (2016) a révélé une augmentation de l'activité de filtration (+3% ; et par conséquent, une ingestion plus élevée) chez l'huître, *C. gigas*, après 2 mois d'exposition à des micro-PS de 2 et 6 µm. Les auteurs ont attribué cette hausse à un effet de compensation pour tenter de pallier la réduction d'entrée d'énergie par l'alimentation comme suggéré par les sorties du modèle energétique (Sussarellu *et al.*, 2016). Chez le crabe, *Carcinus maenas*, l'ingestion de nourriture comprenant des microfibres en PP (1-5 mm) a considérablement réduit sa consommation de nourriture (de 0,33 à 0,03 g par jour). L'énergie allouée à sa croissance est ainsi passée de 0,59 à 0,31 kJ/j (Watts *et al.*, 2015). Cet impact sur la croissance a pu être mesuré chez le nématode, *Caenorhabditis elegans*, dont la longueur du corps a été réduite de manière significative après 2 jours d'exposition à des MP de type PA, PE, PP, PVC (20-200 µm) et micro-PS (0,1 ; 1 et 5 µm) à cause d'une diminution de son efficacité d'assimilation (Lei *et al.*, 2018). Une inhibition de la croissance et une diminution du niveau intracellulaire en chlorophylle-a ont également été rapportées chez l'algue verte, *Scenedesmus obliquus*, exposée à des nano-PS de 70 nm (Besseling *et al.*, 2014). Des études en microcosme ont permis de mettre en évidence une augmentation de la consommation en oxygène (Green,

2016) et de l'activité de filtration (Green *et al.*, 2017) chez l'huître, *Ostrea edulis*, à l'issue d'une exposition à des MP (0,6-363 µm) type PLA et PE. Il a également été démontré que la perturbation de la filtration chez *O. edulis* s'était répercutée sur la biodiversité de l'écosytème reconstitué, à travers une diminution de la diversité des communautés associées au récif (*e.g.* polychètes et oligochètes), de la biomasse des producteurs primaires (*e.g.* cyanobactéries) et les flux de nutriments à l'interface eau/sédiment (Green *et al.*, 2017). Ainsi, l'ingestion et le simple transit de MNP peuvent influencer le métabolisme énergétique des individus. Ce dérèglement des flux énergétiques à l'échelle individuelle peut avoir des conséquences à l'échelle populationnelle et écosystémique. En considérant l'interaction proie-prédateur, une carence énergétique induite par les MNP chez un organisme pourrait également entraver l'absorption d'énergie et le développement d'un organisme appartenant à un niveau trophique supérieur et perturber le flux d'énergie sur l'ensemble du réseau trophique (Xu *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le déséquilibre énergétique peut également se répercuter sur d'autres compartiments biologiques tels que la reproduction. Chez l'huître *C. gigas*, Sussarellu *et al.* (2016) ont révélé une diminution du nombre total d'ovocytes (–38%) ainsi qu'une réduction de la motilité des spermatozoïdes (–23%). Il a également été démontré, chez *D. magna*, qu'une exposition à des MP en PE (1 et 100 µm) a non seulement réduit sa taille corporelle mais également le nombre total de nouveau-nés au cours des trois premières pontes. De plus, la taille corporelle des nouveau-nés a diminué et diverses malformations au cours du développement ont été observées (Rehse *et al.*, 2016). En effet, la toxicité des MNP sur les stades adultes des organismes peut entraîner des effets sur la génération suivante voire plusieurs générations. Par exemple, après avoir été exposés à des nano-PS (50 nm), les mortalités survenues chez le copépode (*Tigriopus japonicus*) à la première génération (EC_{50} survie = 2,15 µg.ml^{-1}) sont intervenues plus tôt chez la seconde génération (EC_{50} survie = 0,16 µg.ml^{-1}), démontrant une augmentation de la sensibilité de *T. japonicus* face au NP (Lee *et al.*, 2013). Les jeunes stades de vie (*i.e.* gamètes, embryons, larves) peuvent également être directement impactés par les MNP. Il a été démontré qu'une exposition à des MNP (billes en PS de 50 et 500 nm) diminue significativement le taux de fécondation des gamètes et altère le développement embryo-larvaire en provoquant diverses malformations du manteau et de la coquille (Tallec *et al.*, 2018). En effet, de nombreux organismes marins ont recours à la fécondation externe caractérisée par une vie larvaire pélagique (*e.g.* bivalves), ce qui les rend directement vulnérables à la contamination MNP. Du fait de leur taille et de leur capacité à se transloquer, les NP seraient d'ailleurs plus propices aux interactions avec les jeunes stades de vie.

La présence des MNP peut également entraîner des effets comportementaux directement ou indirectement au travers de perturbations énergétiques, tissulaires, cellulaires et moléculaires (Galloway *et al.*, 2017). Par exemple, l'exposition aux micro-PS (15 µm) aurait significativement

diminué la nage et la capacité d'exploration du juvénile de Sébaste coréen, *Sebastes schlegelii*, à la suite d'une réduction d'entrée d'énergie (Yin *et al.*, 2018). Des effets similaires ont été observés chez le Carassin (*Carassius carassius*) par transfert trophique, *i.e.* après l'ingestion de Daphnies (*D. magna*) préalablement exposées à des microalgues (*Scenedesmus sp.*) mélangées à des nano-PS (24 et 27 nm) (Mattsson *et al.*, 2015). Les auteurs ont démontré une diminution de l'activité de *C. carassius*, une modification de la prédation, une augmentation du temps d'alimentation, un regroupement plus important des individus et une diminution du comportement exploratoire (Mattsson *et al.*, 2015).

ii. Aux niveaux cellulaire et moléculaire

La contamination interne du système circulatoire, des tissus et des organes de l'organisme par les plus petits MP et les NP entraîne divers effets sub-léthaux à l'échelle cellulaire et moléculaire. Ces effets se traduisent généralement par un stress oxydant, une réponse immunitaire, une altération de l'expression des gènes et/ou un dérèglement du système endocrinien (Qiao *et al.*, 2019). Le stress oxydant est un système de défense qui implique de nombreux processus régulièrement utilisés comme bio-marqueurs en écotoxicologie (Du *et al.*, 2018). En effet, en condition de stress, le stress oxydant peut perturber l'équilibre d'un organisme à faire face aux dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS), ce qui peut stimuler des mécanismes antioxydants et causer des dommages oxydatifs au niveau moléculaire (Prokić *et al.*, 2018). Les ROS sont naturellement présents dans l'organisme à des niveaux modérés (Du *et al.*, 2018). Cependant, un excès de ROS peut endommager la perméabilité des membranes cellulaires et la structure d'autres molécules, comme l'ADN, les protéines et les lipides. Les dommages provoqués sur ces molécules entraînent donc une série de réactions telles que des réponses inflammatoires, des phénomènes d'apoptose et des lésions tissulaires (Bartoskova *et al.*, 2013). Ce stress oxydant peut être ré-ajusté grâce à la production de radicaux libres et d'autres défenses antioxydantes, qui équilibrent les ROS excessifs et réparent les cellules endommagées (Sayre *et al.*, 2005). Plusieurs études ont démontré que ces mécanismes sous-jacents au stress oxydant étaient impliqués chez les organismes aquatiques exposés aux MNP. Par exemple, Lei *et al.* (2018) ont indiqué que les MP type PE, PP, PVC (20-200 µm) et micro-PS (0,1 ; 1 et 5 µm) ont entraîné un stress oxydatif chez *C. elegans* en activant l'expression de GST (glutathion S-transférase ; **Figure 20**) : grande famille d'enzymes impliquée dans les mécanismes de détoxification. Curieusement, les individus exposés aux micro-PS de taille intermédiaire (*i.e.* 1 µm) ont révélé une expression de GST significativement plus élevée que ceux exposés aux micro-PS de 0,1 et 5 µm (**Figure 20**). Cette réponse « non linéaire » dénote toute la subtilité et la complexité d'étudier les mécanismes mis en jeu face au stress MNP. Les propriétés des particules (*e.g.* tailles, nature, propriétés physico-chimiques, etc.) mais également

les modèles biologiques semblent avoir une grande importance dans les réponses observées en (éco)toxicologie.

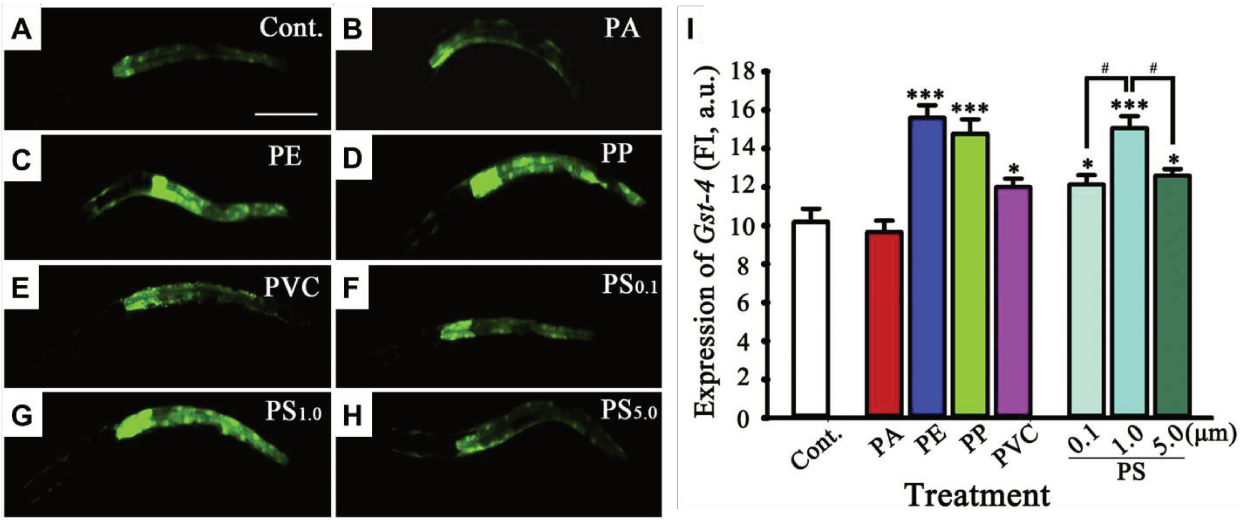


Figure 20. Effets de l'exposition aux microplastiques sur l'expression de *gst-4::GFP* (*glutathione S-transférase 4*::*Green Fluorescent Protein*) chez *Caenorhabditis elegans* (souche transgénique CL2166). **A**-**H** : expression de *gst-4::GFP* chez les nématodes contrôles (**A**) et ceux exposés aux MP de type PA (**B**), PE (**C**), PP (**D**), PVC (**E**) de 20-200 µm et micro-PS de 0,1 (**F**), 1 (**G**) et 5 (**H**) µm. **I** : intensité de fluorescence de *gst-4::GFP* mesurée dans les nématodes exposés aux différentes conditions. *D'après Lei et al. (2018) – Science of The Total Environment.*

Par ailleurs, des chercheurs ont découvert que la réponse au stress MNP était liée à l'activation de certaines voies de signalisation ou à l'expression de certains gènes. Par exemple, après une hausse significative des niveaux de ROS intracellulaires, Jeong *et al.* (2017) ont constaté que les nano-PS (50 nm) activaient la voie de signalisation MAPK (*mitogen-activated protein-kinases*) p38/ERK/NRF2 impliquée dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif chez le copépode *Paracyclopina nana*. Cette même voie de signalisation a été observée chez *C. elegans* après une exposition prolongée à des micro-PS de 0,1 µm (Qu *et al.*, 2019). Une autre étude a révélé que les micro-PS (1 µm) déclenchaient un stress oxydatif chez le corail, *Pocillopora damicornis*, en réprimant les mécanismes de détoxification mais également ceux impliqués dans le système immunitaire à travers les voies JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) (Tang *et al.*, 2018). En effet, le stress oxydant est également associé à une déstabilisation du système lysosomale (von Moos *et al.*, 2012), une modulation du système immunitaire (Paul-Pont *et al.*, 2016 ; Détrée et Gallardo-Escárate, 2018 ; Green *et al.*, 2019) ou encore des phénomènes de génotoxicité (*i.e.* détérioration de l'ADN ; Avio *et al.*, 2015a) chez la moule *Mytilus spp*. Pour ces raisons, les approches « omiques » (*e.g.* génomique, transcriptomique, protéomique) sont des méthodes de plus en plus utilisées pour caractériser l'ensemble des voies moléculaires impliquées dans la réponse au stress MNP mais

aussi pour explorer les mécanismes de résilence. Par exemple, après une exposition de 18 jours à des micro-PE (1-50 µm), une perturbation globale de l'homéostasie a été observée chez *M. galloprovincialis* entraînant la production de protéines impliquées dans la réponse au stress et l'immunité. Ces mécanismes physiologiques ont été associés à des coûts énergétiques importants forçant l'organisme à une re-allocation de l'énergie vers la maintenance de son homéostasie au détriment de sa croissance (Détrée et Gallardo-Escárate, 2018). Par ailleurs, après une période de récupération (28 jours post-exposition), les auteurs ont démontré lors d'une seconde phase d'exposition (18 jours) que l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress et l'immunité avaient diminué. Cette réponse de *M. galloprovincialis* traduit sa capacité à établir des mécanismes d'acclimatation de type « stress-memory » lors d'une exposition répétée aux MP (Détrée et Gallardo-Escárate, 2018).

D'autres mécanismes moléculaires ont été rapportés impliquant des phénomènes de cytotoxicité. Par exemple, une diminution de l'activité enzymatique (*i.e.* estérase ; Seoane *et al.*, 2019) et une inhibition de l'activité photosynthétique (Luo *et al.*, 2019) chez les microalgues *Chaetoceros neogracile* et *Chlorella vulgaris* exposées respectivement à des micro-PS (0,5 et 2 µm) et des MP broyés à partir de film plastique en PU, pourraient inhiber leur croissance. Une perturbation du système endocrinien a également été mise en évidence chez le medaka *Oryzias latipes* exposé pendant deux mois à des MP (< 500 µm) issus de granulés (PE) broyés (Rochman *et al.*, 2014). Cette perturbation s'est traduite par une altération de l'expression des gènes codant pour la choriogénine chez les mâles ainsi que la vitellogénine, la choriogénine et le récepteur à œstrogènes (ERα) chez les femelles. L'analyse histologique a également révélé une prolifération anormale des cellules germinales chez un mâle (Rochman *et al.*, 2014). Ainsi, cette étude démontre toute l'importance de comprendre les réponses à différents niveaux d'organisation, notamment celles induites aux niveaux inférieurs (*i.e.* cellulaire et moléculaire) qui peuvent servir d'indicateurs précoces d'impacts pour des niveaux plus élevés d'organisation (*i.e.* organisme, population) (Ankley *et al.*, 2010).

6.2.2. Impact chimique

i. Transfert de polluants environnementaux

Dans l'eau, les plastiques sont connus pour adsorber et concentrer des polluants organiques persistants (POP) ainsi que des polluants inorganiques (*i.e.* métaux traces) (Teuten *et al.*, 2009). Ces polluants peuvent atteindre des gradients de concentrations bien plus élevés à la surface du plastique que dans son milieu environnant (Teuten *et al.*, 2009). Par exemple, certains MP (PS et PVC) prélevés *in situ* peuvent accumuler et atteindre des concentrations en métaux traces jusqu'à 800 fois plus élevées que celles de l'eau de mer environnante (Brennecke *et al.*, 2016). Aussi, des études en laboratoire ont mis en évidence que ces polluants peuvent être transmis

aux organismes par désorption suite à l'ingestion de débris plastiques (Browne *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2015 ; Lu *et al.*, 2018). Ces processus d'adsorption et de désorption varient en fonction des contaminants, des polymères, de la taille et du caractère hydrophobe du contaminant ainsi que des conditions environnementales (*e.g.* température, pH, salinité) (Teuten *et al.*, 2009 ; Bakir *et al.*, 2012). La désorption des contaminants peut également varier en fonction des conditions physiologiques lors de l'ingestion des MNP avec la présence d'agents tensio-actifs dans l'intestin et l'augmentation de la température qui conduisent à une désorption accrue (Bakir *et al.*, 2012).

Parmi les POP, plusieurs sont considérés comme toxiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides (*e.g.* dichlodiphényl-trichloroéthane [DDT], l'hexachlorocyclohexane [HCH], hexachlorobenzène [HCB]). Ils peuvent induire des perturbations du système endocrinien, des mutagenèses et/ou cancérogenèses et peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire (Avio *et al.*, 2017). Par exemple, lorsque des MP (< 500 µm issus de granulés en PE broyés) sont combinés à des POP (HAP et PCB) puis ingérés par le Medaka (*O. latipes*), l'expression des gènes et le fonctionnement du système endocrinien peuvent être altérés de manière plus importante qu'après l'ingestion des MP seuls (Rochman *et al.*, 2014) : on parle d'effets synergiques. En revanche, certains travaux mettent en évidence des effets antagonistes où les polluants associés aux MNP vont atténuer les effets liés aux contaminants seuls. C'est le cas des micro-PS-NH_2 (200 nm) qui, associés au glyphosate (5 $mg.L^{-1}$), atténuent l'inhibition de la croissance liée au glyphosate seul (5 $mg.L^{-1}$) chez la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2018). Concernant les métaux traces, le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb) peuvent également être très toxiques pour les organismes en cas de fortes doses ou de chronicité d'exposition à de faibles doses (X. Wu *et al.*, 2016). Une étude a révélé qu'en présence de micro-PS (5 µm), le Cd s'accumule davantage dans les tissus du poisson zèbre (*D. rerio*) se traduisant ainsi par une toxicité accrue (*i.e.* dommage oxydatif et inflammation tissulaire) dose-dépendante (Lu *et al.*, 2018). La majorité de ces polluants environnementaux (HAP, PCB, pesticides et métaux) ont été classés comme polluants prioritaires par l'agence Américaine de Protection de l'Environnement (US EPA) et font l'objet de surveillance environnementale. Cependant, bien que plusieurs travaux aient pu mettre en évidence leur présence dans des MP *in situ* (Ashton *et al.*, 2010 ; Rios *et al.*, 2010), l'implication des MP dans le transport de ces polluants de l'eau de mer aux organismes semblerait négligeable (Koelmans *et al.*, 2013). En effet, la présence d'autres matières particulaires minérales et organiques ainsi que la respiration et l'alimentation, sont autant de voies de transport pour ces polluants (Koelmans *et al.*, 2013). En revanche, l'implication des MNP comme vecteurs d'additifs chimiques est inhérent aux matières plastiques. Les additifs représentent donc un plus grand problème notamment parce que leurs

concentrations à la surface des plastiques sont nettement plus importantes que celles des polluants environnementaux adsorbés (Thompson *et al.*, 2009).

ii. Transfert d'additifs chimiques

Bien que les plastiques soient généralement considérés comme des matières biochimiquement inertes (Teuten *et al.*, 2009), les additifs incorporés lors de leur fabrication pour modifier leurs propriétés et prolonger leur durée de vie peuvent influencer la toxicité des MP pour l'organisme (Thompson *et al.*, 2009). Parmi ces additifs, le nonylphénol, les éthers diphényliques polybromés (PBDE), les phtalates et le bisphénol A (BPA), sont des additifs couramment utilisés et réputés pour être des produits chimiques nocifs pour les organismes (revue dans Hermabessiere *et al.*, 2017). Ces additifs chimiques peuvent perturber le système endocrinien en interférant avec la synthèse d'hormones (Barnes *et al.*, 2009 ; Talsness *et al.*, 2009). Ce déséquilibre hormonal peut impacter la reproduction, le développement et la cancérogenèse (Talsness *et al.*, 2009). Les phtalates ont été associés à de nombreux effets tels que des dommages génotoxiques (*e.g.* micronoyaux et phénomène d'apoptose dans les hémocytes de moule), des inhibitions de locomotion chez les invertébrés et des phénomènes d'imposexe chez les poissons (Oehlmann *et al.*, 2009). Le BPA est également extrêmement toxique puisqu'il peut affecter la reproduction et le développement de l'individu de différentes manières en fonction de sa concentration et de l'organisme concerné. Par exemple, le BPA (1,75-2,40 $\mu g.L^{-1}$) peut retarder l'ovulation chez les femelles et réduire la qualité des gamètes mâles chez la truite commune, *Salmo truta* (Lahnsteiner *et al.*, 2005).

Lors de la décomposition des plastiques, ces additifs peuvent migrer de la matrice polymère. Le degré auquel ces additifs se dissocient de la matière plastique est dépendant de la taille des pores de la matrice, qui varie en fonction du polymère, de son état de vieillissement (*i.e.* induit par les facteurs environnementaux) et de l'additif (Ng et Obbard, 2006 ; Moore, 2008 ; Teuten *et al.*, 2009). Ainsi, ces composés chimiques peuvent désorber (directement ou indirectement après adsorption) progressivement dans l'environnement ou dans l'organisme après ingestion et assimilation (Teuten *et al.*, 2009). Par exemple, après avoir déployé et laissé incuber des granulés (PE) dans l'environnement naturel pendant 2 mois, Rochman *et al.* (2013b) ont démontré que les granulés avaient adsorbé des PBDE. Ces granulés ont ensuite servi à produire des MP (< 500 µm) qui ont été exposés au Medaka (*O. latipes*). Les auteurs ont démontré qu'une quantité significative de PBDE s'était accumulée dans l'organisme, et était associée à une toxicité hépatique et une pathologie incluant une diminution des réserves de glycogène et des nécroses cellulaires (Rochman *et al.*, 2013b). Par ailleurs, bien qu'une toxicité chimique directe puisse survenir suite à l'ingestion de plastique, une toxicité indirecte peut également se produire par la lixiviation des plastiques (*i.e.* à travers la désorption de produits chimiques dans l'environnement de l'organisme en l'absence d'ingestion de plastique). En effet, des études ont

pu démontrer le potentiel de toxicité chimique indirecte que pouvait avoir les plastiques sur les organismes aquatiques par l'utilisation de lixiviats (*i.e.* eau dans laquelle des plastiques ont incubé) (*e.g.* Lithner *et al.*, 2009, 2012 ; Bejgarn *et al.*, 2015 ; H.-X. Li *et al.*, 2016 ; Gandara e Silva *et al.*, 2016). Par exemple, H.-X. Li *et al.* (2016) ont préparé des lixiviats issus de sept catégories de plastique (*i.e.* HDPE, LDPE, PP, PVC, PC, PET et PS) pour évaluer la toxicité de chacun d'eux sur la survie et le recrutement des larves de balane *Amphibalanus amphitrite*. Ces lixiviats ont été préparés en laissant incuber des morceaux de plastique (1 × 1 cm) dans 20 ml d'eau de mer filtrée (0,5 $m^2.L^{-1}$) pendant 24 h à 28°C. Les lixiviats ont été obtenus en filtrant les morceaux de plastique pour ne conserver que l'eau de mer. Ils ont ensuite été exposés aux larves de *A. amphitrite* et les résultats ont révélé une augmentation des mortatliés (+11 à 12%) ainsi qu'une inhibition du recrutement larvaire (–30 à 42%) par rapport aux larves placées en condition contrôle (*i.e.* eau de mer qui n'a pas été en contact avec du plastique) (H.-X. Li *et al.*, 2016). Ainsi, certains auteurs estiment que la désorption d'additifs dans la matrice environnante est tellement importante que la mesure des concentrations de certains d'entre eux (*e.g.* phtalates) pourrait permettre de tracer la contamination plastique (Fossi *et al.*, 2012). Dans l'ensemble, les travaux qui portent sur la toxicité chimique des MNP mettent en évidence la nécessité d'effectuer des analyses chimiques sans *a priori* pour cibler un large éventail de produits chimiques associés aux MNP afin de mieux identifier le ou les composé(s) potentiellement responsable(s) de la toxicité observée dans les études (éco)toxicologiques.

7. Contamination microplastique dans les produits de la pêche et de l'aquaculture : un risque pour la santé humaine ?

La consommation de produits de la mer représente une voie de contamination en MNP pour l'Homme. Cependant, ces ressources halieutiques et aquacoles permettent de répondre aux besoins protéiques des populations afin de réduire la faim et la pauvreté dans le monde. En 2017, la consommation mondiale de fruits de mer représentait 7% de toutes les protéines consommées et environ 17% de la consommation de protéines animales (FAO, 2020). Aujourd'hui, 10 à 12% de la population mondiale dépendent de la pêche et de l'aquaculture pour leur subsistance. Ces populations vivent généralement dans les pays en développement, où les possibilités d'emploi et les ressources alimentaires sont limitées (FAO, 2020). La pêche et l'aquaculture mondiales, à grande et petite échelle, sont donc des éléments vitaux pour les communautés mondiales. Ainsi, la contamination des fruits de mer par les MNP représente une menace pour les cheptels, la pérennité des filières et la santé humaine. Paradoxalement, la pêche et l'aquaculture sont à la fois menacées et menaçantes car leurs infrastructures sont

largement consituées de plastique (Lusher *et al.*, 2017a), représentant ainsi une source considérable de MNP.

Les MP sont présents dans de nombreuses espèces destinées à la consommation humaine, notamment les invertébrés, les crustacés et les poissons (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014 ; Rochman *et al.*, 2015). Par exemple, Rochman *et al.* (2015) ont identifié des MP (> 500 µm) dans 25 à 28% des poissons sauvages pêchés et vendus sur les marchés de Makassar (Indonésie) et de Californie (États-Unis). Par ailleurs, Van Cauwenberghe et Janssen (2014) ont constaté que les moules d'élevage présentaient des concentrations en MP significativement plus élevées que les moules pêchées dans le milieu naturel. Comme vu précédemment au paragraphe *6.1.1*, les particules de plastique se concentrent essentiellement dans le tractus digestif de l'animal, de sorte que les bivalves et autres organismes consommés entiers sont plus susceptibles d'être des vecteurs de MNP dans le régime alimentaire de l'Homme (GESAMP, 2015). De plus, les bivalves sont d'un intérêt particulier puisque la plupart d'entre eux sont des organismes filtreurs suspensivores, les exposant ainsi directement aux MNP présents dans la colonne d'eau (Van Cauwenberghe et Janssen, 2014). À ce jour, les niveaux de contamination microplastique les plus bas recensés chez la moule, *M. edulis*, sont aux alentours de 0,15 MP/g de chair humide (Hermabessiere *et al.*, 2019). En revanche, les niveaux de contamination les plus élevés sont supérieurs à 5 MP/g (Qu *et al.*, 2018). En raison de leur tradition culinaire, les belges présentent la consommation de moules la plus élevée au monde avec près de 250 g de moules/jour/personne (FAO, 2017). En considérant la concentration en MP la plus élevée mesurée dans les moules (*i.e.* 5 particules/g), un haut consommateur belge (top 5%) consommerait 1 250 MP/jour. Certes, ces valeurs correspondent au pire des scénarios, à travers l'ensemble des populations, de ce qui peut résulter de la consommation de moules. Cependant, les vecteurs de MNP dans l'alimentation humaine sont multiples et ne se limitent pas à la consommation de produits de la mer. Des études ont permis de mettre en évidence la présence de MP dans de la bière (Liebezeit et Liebezeit, 2014), du miel (Liebezeit et Liebezeit, 2013) ou encore du sel de table (Yang *et al.*, 2015). Par exemple, Yang *et al.* (2015) ont estimé que l'apport total de MP provenant du sel pourrait atteindre 37 MP par individu et par an. Par ailleurs, les informations actuelles sont insuffisantes pour évaluer la quantité réelle de MNP à laquelle les humains peuvent être exposés *via* les aliments (Lusher *et al.*, 2017a). La dose journalière tolérable pour les plastiques n'étant pas encore établie, il n'est donc pas possible de déterminer un niveau d'exposition conforme à une norme (FAO, 2017). Pourtant, les effets potentiels sur la santé humaine dépendent des concentrations d'exposition mais aussi de la taille et des substances chimiques associées aux particules plastiques. Pour ces raisons, les MNP représentent une préoccupation émergente en termes de sécurité sanitaire (Lusher *et al.*, 2017a). Selon l'état actuel des connaissances sur la toxicité des MNP, le risque associé à la consommation de produits de la pêche et de l'aquaculture contaminés par des MNP serait

relativement faible (FAO, 2017). Néanmoins, une communication coréenne au colloque scientifique international « MICRO2018 » estimait à environ 7% la contribution des produits de la mer dans la contamination humaine en MP (données non publiées ; Arnaud Huvet, Com. Pers.). Par ailleurs, des mesures préventives et correctives doivent être prises aux niveaux international, gouvernemental et individuel (consommateur) pour évaluer la toxicité des polymères les plus courants, réduire l'utilisation du plastique et encourager l'utilisation de matériaux alternatifs, le recyclage et l'adoption de pratiques durables dans l'utilisation des plastiques et la gestion de la pollution plastique (FAO, 2017).

CHAPITRE II

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLÉMATIQUE DU PROJET DE THÈSE

CHAPITRE II : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLÉMATIQUE DU PROJET DE THÈSE

1. L'huître perlière *Pinctada margaritifera* : un modèle biologique d'intérêt écologique et économique en Polynésie française

1.1. Systématique et distribution géographique

L'huître perlière *Pinctada margaritifera* (Linné, 1758) variété *cumingi* (Jameson, 1901) est un mollusque bivalve de la famille des Pteriidae (**Tableau 5**). Le genre *Pinctada* tire son appellation du portugais « pintada » qui signifie « pintade » en français, en référence à sa coquille tâchetée semblable au plumage de l'oiseau (Le Pennec, 2010). La systématique des espèces et variétés du genre *Pinctada* a longtemps fait l'objet de révisions. En effet, plus de 100 espèces ont été décrites jusqu'à présent, aujourd'hui regroupées en 17 espèces (WoRMS, 2020). Connue sous le nom d'huître perlière à lèvres noires (black lip pearl oyster), *P. margaritifera* var. *cumingi* est communément appelée « nacre » ou « parau » en Polynésie française.

Tableau 5. Classification taxonomique de l'huître perlière *P. margaritifera* var. *cumingii*. *D'après WoRMS – World Register of Marine Species / NCBI taxonomy database ID: 180451*.

Classification		Découvreur
Embranchement	Mollusca	Cuvier, 1795
Classe	Bivalvia	Linné, 1758
Sous-classe	Pteriomorphia	Beurlen, 1944
Ordre	Ostreida	Newell, 1965
Super-famille	Pterioidea	Gray, 1948
Famille	Pteriidae	Gray, 1948
Genre	*Pinctada*	Röding, 1758
Espèce	*Pinctada margaritifera*	Linné, 1758
Variété	*Pinctada margaritifera* var. *cumingi*	Jameson, 1901

P. margaritifera est une espèce répartie dans de nombreuses régions du globe, principalement inféodée aux régions coralliennes tropicales et subtropicales de l'Indo-Pacifique (Gervis et Sims, 1992). Cependant, la variété *cumingii* se retrouve quasi-exclusivement en Polynésie française (Lal *et al.*, 2018) où elle est exploitée pour la production de perles et de nacres. L'huître perlière se rencontre principalement à l'intérieur des lagons entre 0 et 50 m de profondeur fixée à un substrat dur par son byssus (Zanini, 1999 ; Andréfouët *et al.*, 2016).

Quelques spécimens ont également été retrouvés sur la pente externe des récifs et sur des fonds sableux (Zanini, 1999).

1.2. Morphologie et anatomie

1.2.1. Coquille

La coquille de *P. margaritifera* est formée de deux valves dissymétriques (*i.e.* l'une plus convexe que l'autre) jointes par une charnière constituée d'un ligament. Ces deux valves sont reliées et maintenues en occlusion par un muscle adducteur. Chez l'adulte, la coquille peut atteindre une largeur de 12 cm et une hauteur de 30 cm. La face externe de la coquille est de nature prismatique, relativement sombre mais dotée de rayons blanchâtres qui divergent de la charnière. Plusieurs stries concentriques se succèdent également au fur et à mesure que l'animal grandit ; elles se terminent par des barbes de croissance à la périphérie. La face interne est quant à elle dotée d'une bordure noire sur toute la périphérie de la coquille, caractéristique de l'espèce, dont elle tire son nom (huître perlière à « lèvres noires »). La partie centrale de la face interne est en revanche nacrée avec un pourtour irisé de couleur bleu, vert, jaune, aubergine ou gris. La coquille est composée de deux fractions distinctes : une phase minérale, qui représente la majeure partie de la coquille, et une phase organique essentielle à la fonction de minéralisation, qui représente 0,1 à 5% de la coquille (Weiner, 1986). Ainsi, de l'extérieur vers l'intérieur, la coquille de *P. margaritifera* se compose successivement des trois couches suivantes : le périostracum (phase organique), l'ostracum (phase minérale ; couche prismatique en calcite) et l'hypostracum (phase minérale ; couche nacrée en aragonite) (Dauphin *et al.*, 2008).

1.2.2. Anatomie

La partie charnue de *P. margaritifera* représente environ 20-25% de la masse totale de l'huître (**Figure 21**). Les principaux organes sont enveloppés par le manteau qui joue à la fois un rôle protecteur mais également un rôle primordial dans la formation coquillère (*i.e.* biominéralisation). Le manteau est l'organe le plus à l'extérieur et se compose de deux lobes palléaux qui tapissent l'intérieur de chaque valve. Il est relié au muscle adducteur ainsi qu'à la masse viscérale et les deux lobes se rejoignent dorsalement le long de la charnière pour former l'isthme. Un peu plus à l'intérieur, les branchies sont quant à elles formées d'un axe branchiale composé de deux lames et quatre lamelles branchiales munies de cils vibratiles. Elles assurent l'oxygénation (respiration) de l'animal et jouent également un rôle dans sa nutrition en captant et filtrant les particules alimentaires. Ces particules sont ensuite acheminées vers les palpes labiaux qui entourent la bouche de l'huître. L'appareil digestif comporte ensuite une glande digestive, un

estomac contenant un stylet cristallin suivi de l'intestin puis l'anus. Concernant les éléments musculaires, l'huître possède un muscle adducteur reliant les deux valves (pour l'ouverture et la fermeture de sa coquille) et un pied relié à des muscles rétracteurs et élévateurs. Le pied joue un rôle dans le déplacement de l'huître mais il est surtout assisté par le byssus sécrété par la glande byssogène qui lui servira à se fixer sur un support. Enfin, la gonade (organe blanchâtre) se situe autour de la masse viscérale et assure la fonction de reproduction. En période de maturité sexuelle, la gonade peut envahir la poche perlière qui est une extension translucide de la masse viscérale présentant une cavité. Cette cavité est utilisée pour produire les perles de culture (voir section *1.7.2*) (Fougerouse-Tsing et Herbaut, 1994). Le système circulatoire de *P. margaritifera* est constitué d'un cœur et de vaisseaux qui assurent la circulation de l'hémolymphe à travers les tissus conjonctifs (Southgate et Lucas, 2008). L'hémolymphe est composée de plasma et d'hémocytes qui sont capables d'infiltrer les tissus. Ces cellules sont impliquées dans le système immunitaire (*e.g.* phagocytose) et jouent un rôle fondamental dans le maintien des fonctions vitales de l'huître (*e.g.* transport des nutriments vers les tissus) (Kuchel *et al.*, 2010).

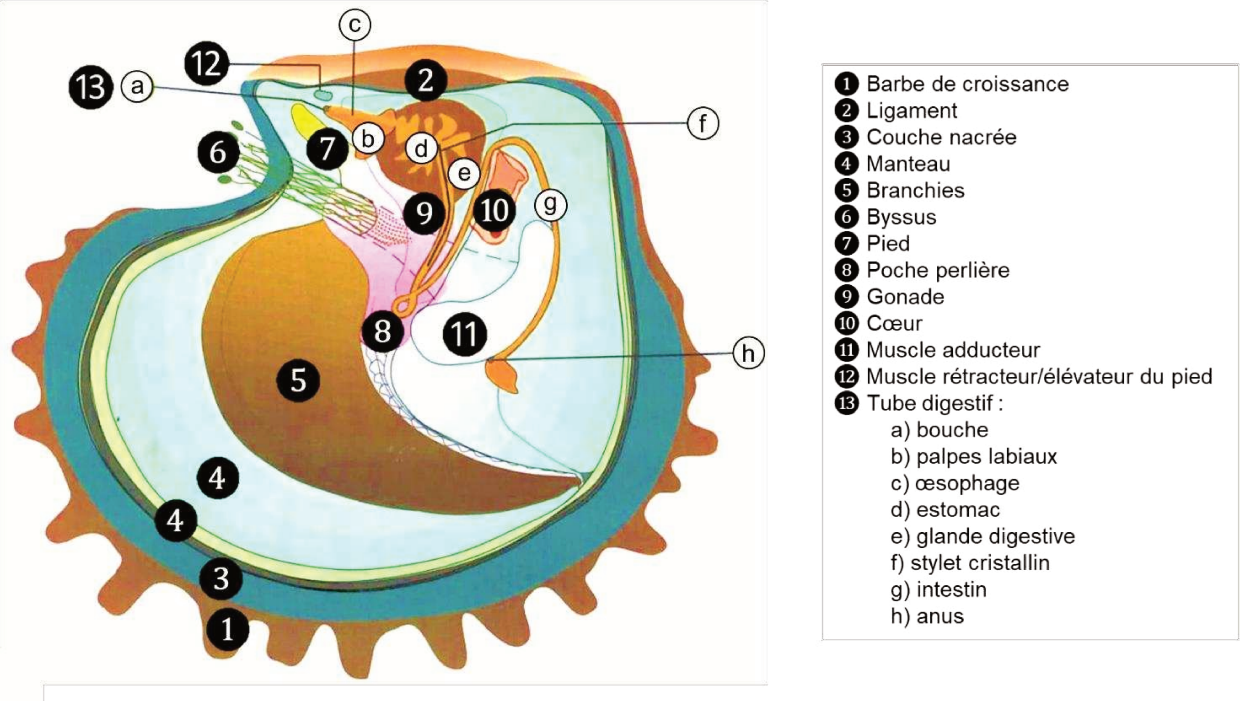


Figure 21. Anatomie de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (valve droite). *Modifié d'après l'EVAAM - Service de la Perliculture.*

1.3. Nutrition

P. margaritifera est un organisme filtreur suspensivore qui se nourrit en filtrant les particules en suspension présentes dans la colonne d'eau grâce à ses branchies (**Figure 22**). En effet, le battement synchrone des cils vibratiles provoque un courant d'eau qui va traverser les branchies. Celles-ci vont capter les particules et les acheminer vers les palpes labiaux où elles sont triées selon leur taille. Les particules < 2 µm ne sont pas retenues par le filtre branchial et retournent directement dans le milieu. Les particules supérieures à 200 µm sont quant à elles enveloppées d'un mucus et rejetées sous forme de pseudo-fèces. En revanche, les particules comprises entre 2 et 200 µm sont ingérées, digérées et assimilées avant d'être rejetées sous forme de fèces (Pouvreau *et al.*, 1999). Cette large gamme de rétention permettrait à l'huître de compenser l'oligotrophie et la dominance du picoplancton dans les lagons polynésiens (Buestel et Pouvreau, 2000). Pour la même raison, *P. margaritifera* présente une capacité de filtration très élevée puisqu'elle est capable de filtrer entre 13 et 26 $L.h^{-1}.g^{-1}$ de poids sec (Yukihira *et al.*, 2000 ; Stephane Pouvreau *et al.*, 2000). A titre indicatif, l'huître creuse *C. gigas* filtre entre 12 et 16 $L\ h^{-1}\ g^{-1}$ de poids sec (Dupuy *et al.*, 2000). En revanche, bien que l'huître puisse se nourrir d'une large gamme de particules (*i.e.* 2-200 µm), son efficacité de rétention est taille-dépendante (**Figure 22**). En effet, le taux de rétention des particules de 1 µm est d'environ 10% puis augmente progressivement pour être optimal (100%) à partir de 5 µm (Pouvreau *et al.*, 1999). Le régime alimentaire de *P. margaritifera* se compose principalement de microalgues de types flagellés autotrophes (*e.g.* Chlorophycées, Cryptophyte, Prymnesiophycées), dinoflagellés (Loret *et al.*, 2000) et de diatomées et coccolithophoridés (Fournier *et al.*, 2012).

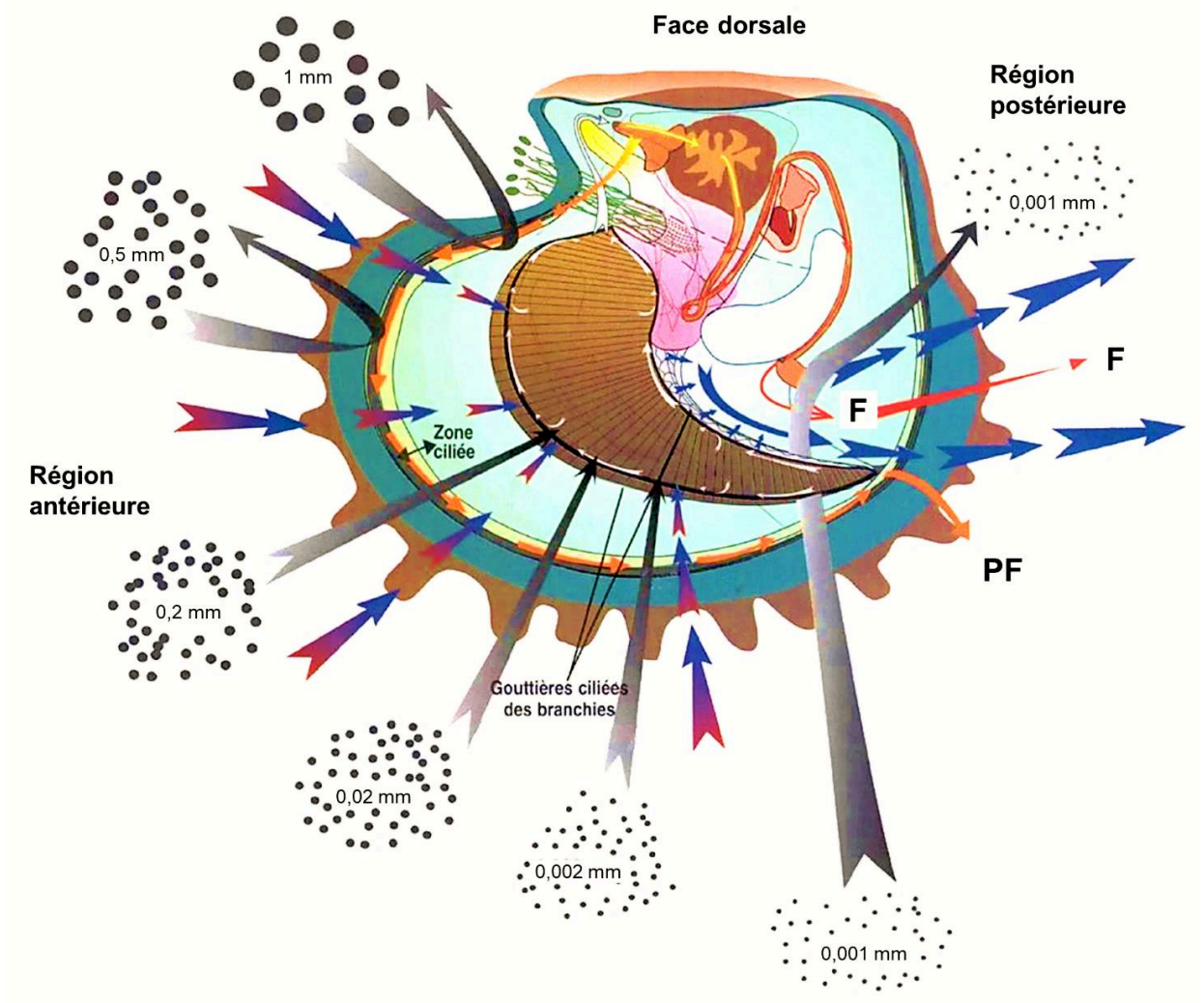


Figure 22. Nutrition de l'huître perlière *P. margaritifera*. Flèche rouge et bleue : courant d'eau entrant ; flèche noire : trajet des particules ; flèche blanche : trajet des particules captées ; flèche jaune : trajet des particules ingérées ; flèche orange : trajet des pseudo-fécès ; flèche rouge : trajet des fèces ; F : fèces ; PF : pseudo-fèces. *D'après l'EVAAM - Service de la Perliculture.*

1.4. Reproduction et cycle de développement

L'huître perlière *P. margaritifera* est un organisme hermaphrodite protandre, *i.e.* 100% des individus âgés d'un an sont mâles puis le sexe femelle apparaît progressivement à partir de 2 ans. Le sex-ratio s'équilibre pour les populations d'individus âgés de plus de 10 ans (Chávez-Villalba *et al.*, 2011). Cependant, le sexe femelle est très instable et son maintien dépend grandement des conditions du milieu (*e.g.* température, nourriture) : on parle d'hermaphrodisme alternatif (Thielley, 1993). En effet, quand les conditions du milieu (naturel ou artificiel) sont défavorables (*e.g.* alimentation insuffisante, manipulation, nettoyage), le pourcentage de

femelles peut être amené à diminuer (Thielley, 1993). Ce déséquilibre du sex-ratio s'effectue en faveur des mâles car leur gamétogénèse serait plus économe énergétiquement que celles des femelles (Chávez-Villalba *et al.*, 2013 ; Teaniniuraitemoana *et al.*, 2016). Par ailleurs, la gamétogénèse chez cette espèce est continue, rapide (~ 1 mois) et s'observe toute l'année avec un asynchronisme des pontes important (Pouvreau *et al.*, 2000). Une fois matures, les huîtres peuvent émettre entre 500 millions et 5 milliards de gamètes mâles (spermatozoïdes, ~ 5 µm) et pondre entre 40 et 50 millions de gamètes femelles (ovocytes, ~ 50 µm). Les gamètes sont libérés dans l'eau et la fécondation est externe, donnant naissance à des larves trocophores qui vont se développer en larves D (J1 post-fécondation), puis véligères (J5), umbonées (J12) et œillées (J22) avant de se métamorphoser en post-larves (**Figure 23**). Cette métamorphose annonce pour l'animal, la fin de sa vie pélagique et le début de sa vie benthique. La post-larve va se développer en juvénile (naissain) qui peut se fixer sur divers types de supports grâce à son byssus jusqu'à devenir adulte. La maturité sexuelle chez l'adulte est atteinte à environ un an, prémisse d'un nouveau cycle de vie.

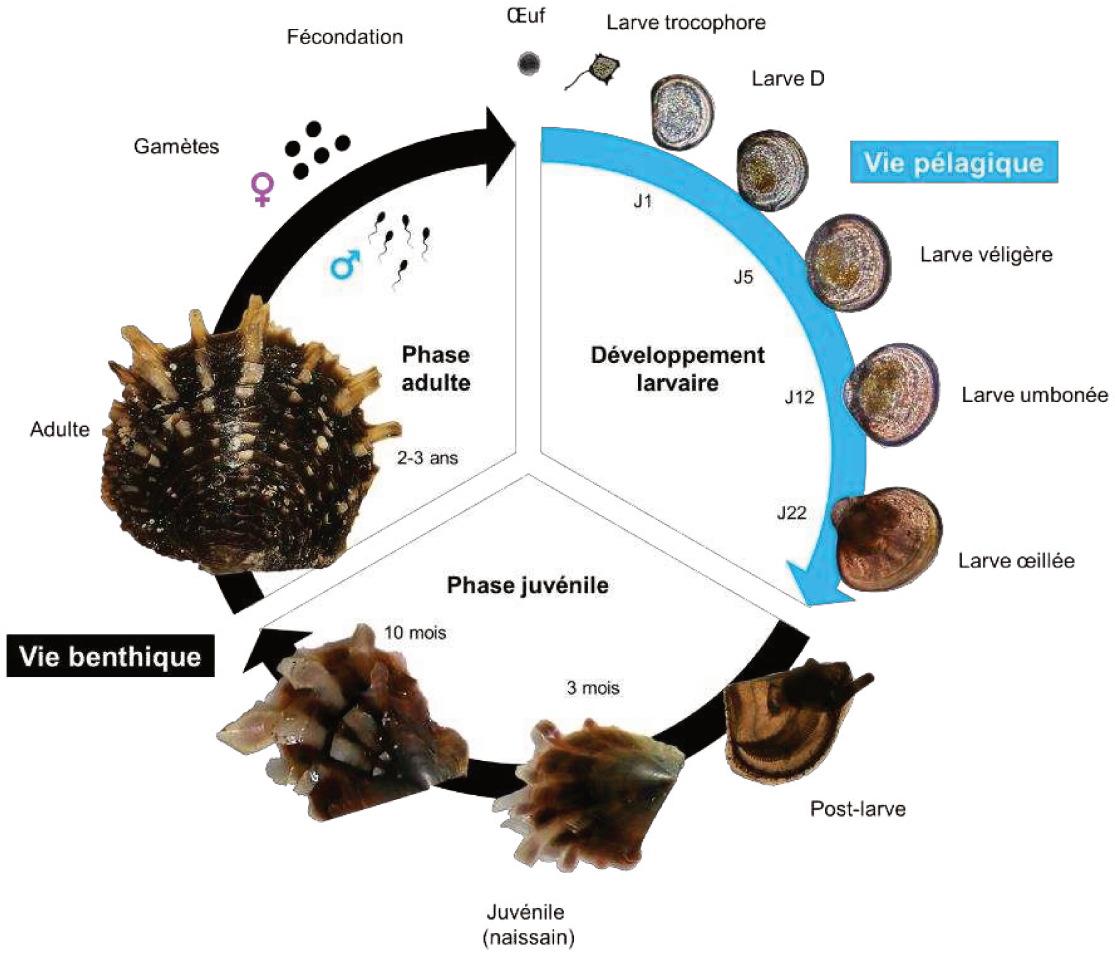


Figure 23. Cycle de développement de l'huître perlière (*P. margaritifiera*).

1.5. Service écosystémique et sentinelle écologique

Comme tous les organismes vivants, l'huître perlière remplit des fonctions écologiques qui participent au bon fonctionnement de l'écosystème. En effet, comme la plupart des organismes filtreurs suspensivores, *P. margaritifera* joue un rôle prépondérant dans la jonction des écosystèmes pélagiques et benthiques en exerçant un contrôle local sur le cycle des nutriments et la productivité primaire (Barbier *et al.*, 2011 ; Gaertner-Mazouni *et al.*, 2012 ; Lacoste et Gaertner-Mazouni, 2016). Ainsi, l'huître perlière participe activement aux cycles biogéochimiques et à la qualité de l'eau en filtrant les particules en suspension et en les éliminant sous forme de biodépôts (*i.e.* fèces et pseudo-fèces). Compte tenu de ces taux de filtration élevés, *P. margaritifera* est un modèle biologique d'intérêt écologique pour l'étude des écosystèmes lagonaires et le suivi de la qualité du milieu (Bernagout *et al.*, 2014). Considérée comme une espèce sentinelle, elle sert d'indicateur précoce des changements de l'environnement. En considérant, la menace microplastique et les caractéristiques biologiques de l'huître perlière, celle-ci pourrait servir d'indicateur de la contamination en MP. De surcroît, la biodéposition est probablement un mécanisme clé par lequel les MP à flottabilité neutre sont transportés des eaux de surface aux sédiments (Cole *et al.*, 2016). Ainsi, en plus d'être une espèce sentinelle, *P. margaritifera* pourrait directement agir sur la distribution et la concentration des MP, ce qui pourrait modifier les communautés algales et la macrofaune benthique et ainsi perturber l'équilibre biologique de l'écosystème lagonaire. En Polynésie-française, cette situation pourrait être exacerbée dans les lagons perlicoles où les densités d'huîtres perlières peuvent atteindre jusqu'à 12 000 individus.ha^{-1}.

1.6. La perliculture en Polynésie française : deuxième ressource économique du territoire

1.6.1. Historique et importance économique

Située au sud de l'océan Pacifique, la Polynésie française est une collectivité d'outre-mer composée de 5 archipels et 118 îles. Elle s'étend sur une surface équivalente à celle de l'Europe (~ 2,5 millions de km^2) et représente 40% de la zone économique exclusive française. Exploitée pour la nacre de sa coquille pendant plusieurs siècles, l'huître perlière *P. margaritifera* était initialement pêchée par les polynésiens pour confectionner des objets, en particulier des leurres, des hameçons et des boutons de nacres (Lintilhac et Durand, 1985). Alors que les perles sont connues et appréciées depuis l'antiquité par l'Occident et l'Orient, elles ne font leur apparition en Polynésie française qu'après la découverte de Tahiti et ses îles par les navigateurs européens à la fin du XVIIIème siècle (Lintilhac et Durand, 1985). À partir de 1825, le commerce de nacres et

de perles naturelles s'organise faisant l'objet d'une grande convoitise. Sans aucun contrôle de la ressource, les huîtres perlières vont être collectées massivement. Alors qu'il ne suffisait que de se pencher pour ramasser les huîtres, celles-ci se font de plus en plus rares à partir de 1830, marquant le début de la plonge. Les précieuses huîtres ont ainsi été récoltées par des plongeurs pouvant descendre jusqu'à 30 mètres de profondeur. Cette technique a été pratiquée pendant près de cent ans, juqu'au début des années 1960. À cette période, la valeur commerciale de l'huître perlière chute ; sa pêche devient de moins en moins productive et moins rentable car les perles naturelles ne se trouvent pratiquement plus (Lintilhac et Durand, 1985). Dès lors, il convient de trouver des solutions pour ne pas abandonner ce secteur d'activité et il s'avère que depuis le début du XXème siècle, les japonnais savent obtenir des perles de culture. Ce savoir-faire couplé à des mesures conservatoires (*e.g.* collectage des naissains d'huîtres, interdiction de pêcher certains stocks naturels) va marquer l'essor d'une industrie nouvelle en Polynésie française : la perliculture. Les débuts de l'activité remontent à 1962 quand Jean-Marie Domard (responsable du « Service de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche ») lance un essai de perliculture dans l'atoll de Hikueru (archipel des Tuamotu). Le spécialiste japonnais, Churoku Muroi, se joint à lui pour greffer plus de 1000 huîtres perlières. L'expérimentation connait un franc succès avec la récolte de plus de 800 perles rondes (Le Pennec, 2010). Cette réussite est telle qu'en 1964, les japonnais annoncent que la perle de Tahiti est « *susceptible d'être promue au rang des bijoux de grande classe* » (Le Pennec, 2010). En 1966, la première ferme perlière privée s'installe dans l'atoll de Manihi. Il faudra attendre une vingtaine d'années avant que n'apparaisse le début de la course à l' « or noir » et l'essor de la filière perlicole (Lintilhac et Durand, 1985).

Aujourd'hui, la perliculture occupe une place importante dans le paysage économique, environnemental et social de la Polynésie française. Deuxième ressource économique après le tourisme, l'activité prend part dans l'aménagement et le développement du territoire (ISPF, 2015). Cette activité est majoritairement concentrée aux Tuamotu-Gambier où elle constitue un secteur clé du développement économique des archipels éloignés et participe à limiter l'exode des populations vers Tahiti (IEOM, 2015). Elle génère environ 5000 emplois distribués dans 638 fermes perlières, réparties dans 25 îles et atolls (DRMM, 2017a). La Polynésie française est le premier exportateur mondial avec près de 9 millions de perles exportées en 2017 pour une valeur d'environ 8 milliards de francs pacifiques (XFP, ≈ 67 millions d'euros). La Chine et le Japon sont les principaux pays importateurs de perles de culture de Tahiti (DRMM, 2017a).

1.6.2. Production d'une perle de culture

La perle de culture est obtenue à l'issue d'une greffe allogénique (*i.e.* le greffon provient d'un autre individu) de l'huître perlière. Cette greffe repose dans un premier temps sur l'obtention d'une bandellette de manteau (tissu biominéralisateur) provenant d'une huître « donneuse »

(sacrifiée) (**Figure 24**). Un morceau sous-jacent à la bordure pigmentée du manteau est découpé afin d'obtenir le greffon. Une fois prêt, le greffon de l'huître « donneuse » va être greffé à une huître perlière « receveuse ». L'acte de greffe est une opération chirurgicale faisant intervenir un opérateur (greffeur) expérimenté (**Figure 24**). L'huître « receveuse » est entrouverte et exposée devant le greffeur qui, à l'aide d'une spatule, va écarter le manteau et les branchies de l'animal pour accéder aux organes internes. Après avoir localisé la masse viscérale de l'huître, le greffeur va créer une cavité en incisant une zone dans le prolongement de la gonade, appelée improprement la « poche perlière ». Cette incision va lui permettre d'insérer le greffon ainsi qu'un nucléus (bille de carbonate de calcium), base de la future perle. Ce nucléus est introduit dans la cavité de la poche perlière au contact du greffon (**Figure 24**). En tout, l'opération dure environ 2 minutes. Les tissus sont ensuite remis délicatement en place puis l'huître « receveuse » est refermée avant de retourner à l'eau. Le traumatisme opératoire fragilise les huîtres qui devront faire l'objet d'une attention particulière contre les prédateurs. Certaines mourront suite à l'opération et d'autres pourront rejetter leur nucléus souvent en raison d'une erreur technique du greffeur. Quand seul le nucléus est rejeté mais que le greffon reste en place, des concrétions se forment à la surface du greffon produisant une « perle keshi » (*i.e.* perle baroque sans nucléus). Si l'opération est réussie et que l'huître cicatrise correctement, la formation de la perle débute (Lintilhac et Durand, 1985).

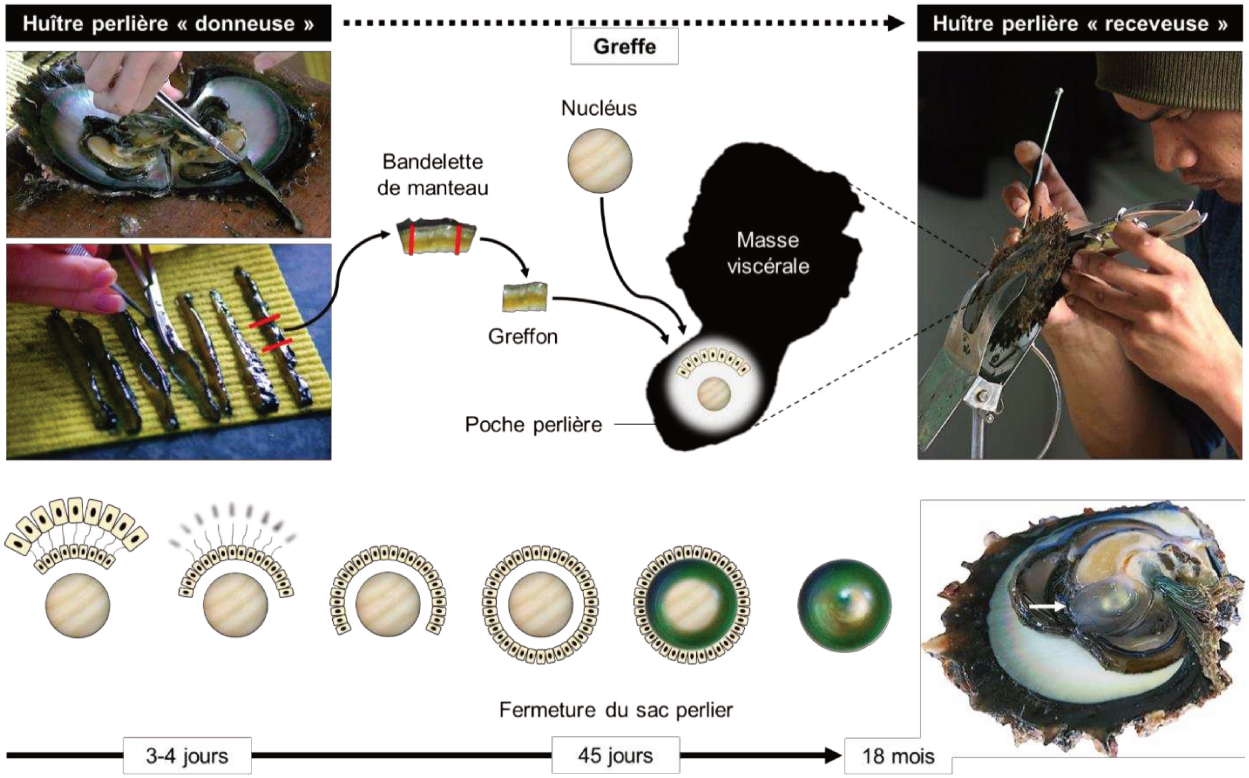


Figure 24. Schéma illustrant le principe d'une greffe chez l'huître perlière (*P. margaritifera*) pour l'obtention d'une perle de culture. *Crédit photographies : Claude Soyez.*

Le greffon qui a été déposé au contact du nucléus va se résorber en partie, alors que l'épithélium externe va proliférer jusqu'à tapisser de cellules épithéliales la surface du nucléus pour former le sac perlier (~ 30 jours post-greffe) (**Figure 24**). Une fois formées, les cellules du sac perlier vont sécréter une trame protéique suivie de dépôts concentriques de nature minérale faite tout d'abord de calcite puis d'aragonite. Plusieurs couches (tablettes) d'aragonite régulières et parallèles vont être sécrétées et déposées à la surface du nucléus en rotation sur lui-même dans le sac perlier (Gueguen *et al.*, 2015 ; Le Moullac *et al.*, 2018). Partant d'un nucléus de 7,5 mm de diamètre, une perle de 11 à 12 mm peut être récoltée au bout de deux ans (**Figure 24**) (Lintilhac et Durand, 1985). La perle récoltée est commercialisée et l'huître productrice peut faire l'objet d'une sur-greffe et suivre un nouveau cycle de production.

2. L'écosystème lagonaire et l'économie de la filière perlicole menacés par la pollution plastique

2.1. Crise économique de la perle

Après avoir connu un développement important jusqu'en 2001, le secteur de la perliculture connait depuis une crise économique profonde, liée à la chute des cours mondiaux et aux difficultés de structuration du secteur (IEOM, 2015). En effet, les fermes perlières se sont rapidement multipliées entre 1980 et 2000 induisant une surproduction de perles (Gueguen *et al.*, 2016). Cette surproduction a provoqué une hausse de la quantité de perles de moins bonne qualité sur le marché, entraînant ainsi une baisse du prix de la perle (**Figure 25**). Vendu 9 584 XFP (~ 80 euros.g^{-1}) en 1986, le gramme de perle s'est vendu 548 XFP (~ 5 euros.g^{-1}) en 2017 (DRMM, 2017a). Cette chute du cours de la perle se manifeste par une baisse très marquée des recettes. Par conséquent, de nombreuses fermes perlières ont fait faillite ce qui a entraîné des pertes d'emplois et une reprise de l'exode vers Tahiti (Gueguen *et al.*, 2016). En plus de ce déclin économique, cette crise de la perliculture est accentuée par certains dysfonctionnements d'ordre écologique. Par exemple, l'épisode d'efflorescence algale survenue dans l'atoll de Takaroa (2016) a entraîné des mortalités importantes sur les cheptels en élevage (Rodier *et al.*, 2019), modifiant une partie de la filière *via* le départ de nombreux producteurs vers l'atoll voisin de Takapoto. Lien de causalité ou pas, ce phénomène rappelle l'étroite relation qui subsiste entre l'exploitation de l'huître perlière, les pratiques d'élevage associées et le fonctionnement de l'écosystème lagonaire (Gaertner-Mazouni *et al.*, 2012 ; Lacoste *et al.*, 2014 ; Lacoste et Gaertner-Mazouni, 2016).

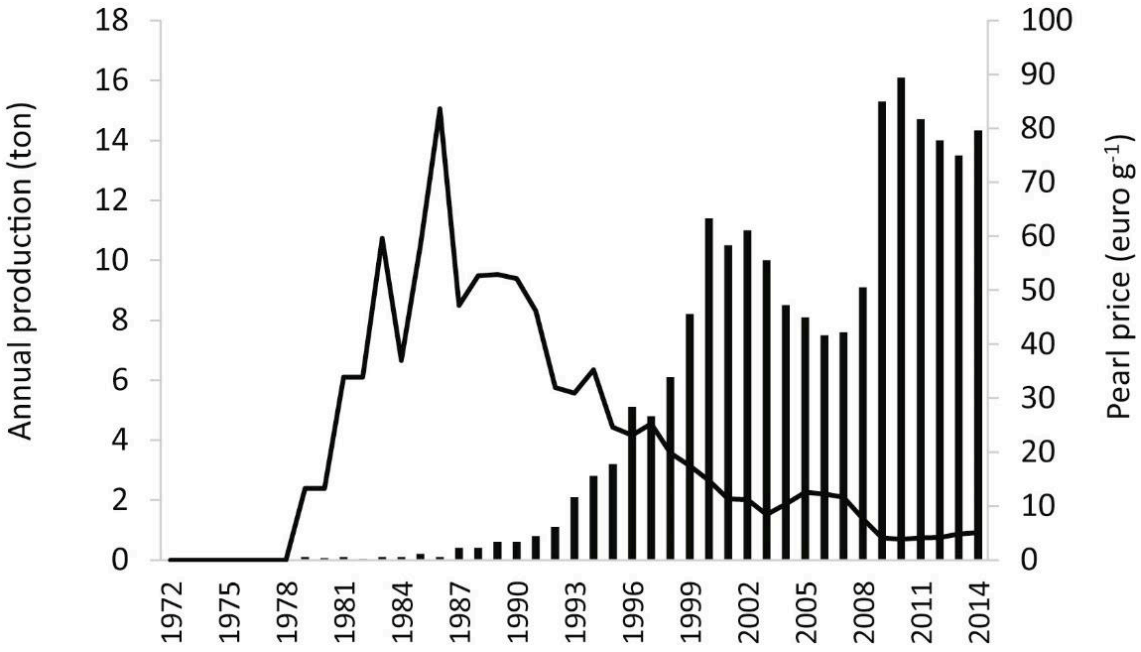


Figure 25. Évolution du poids total de perles exportées et du prix de la perle entre 1972 et 2014. Les données associées au poid total de perles exportées et celles du prix de la perle sont respectivement représentées par l'histogramme (en tonne, échelle de gauche) et par la courbe (en euro.g^{-1}, échelle de droite). *D'après Gueguen et al., 2016 – Estuarine, Coastal and Shelf Science.*

Dans ce contexte de crise, les autorités locales (Direction des Ressources Marines, DRM) et l'ensemble des acteurs de la filière (*e.g.* Ifremer, UPF, IRD, CNRS, EPHE) se sont mobilisés pour participer à la gestion de programmes de recherches et développement afin de pérenniser la ressource, améliorer la rentabilité des entreprises et sécuriser la production (Andréfouët *et al.*, 2012). Ainsi, ces programmes scientifiques encadrent la filière pour tenter de mieux comprendre la biologie de l'espèce (*e.g.* décrire, comprendre, améliorer les processus de greffe et la qualité de la perle) mais également orienter son élevage vers une exploitation durable de la ressource (*e.g.* préservation de la biodiversité des stocks sauvages, gestion intégrée de la perliculture) et appréhender les changements globaux (*e.g.* réchauffement climatique, acidification des océans, pollution plastique). En effet, la considération de l'écosystème lagonaire est déterminante dans un contexte où la filière perlicole polynésienne dépend exclusivement du recrutement naturel (collectage) de naissains. Les itinéraires zootechniques et les cycles de production des perliculteurs sont dictés par les variations saisonnières et les dysfonctionnements environnementaux. Ainsi, des réformes soucieuses de l'environnement ont été votées. C'est le cas de la loi du Pays n° 2017-16 du 18 juillet 2017 et ses arrêtés d'application, qui stipulent que les activités professionnelles sont réglementées notamment par l'instauration de plafonds pour les lignes de collectage et la superficie des concessions maritimes (arrêté n°1259 CM du 31 juillet 2017). En effet, l'installation d'une ferme perlière n'est pas sans conséquence sur le milieu

naturel. L'ensemble des structures utilisées en perliculture et leur concentration dans les lagons peuvent exercer des pressions sur l'écosystème et modifier son bon fonctionnement. Gaertner-Mazouni et Rodriguez (2017) regroupent trois catégories de pressions induites par la perliculture : (1) les pressions induites par les infrastructures nécessaires pour la production, (2) les pressions liées à la physiologie de l'espèce cultivée et (3) les pressions dépendantes des pratiques spécifiques des perliculteurs. Longtemps ignorée, la dernière catégorie constitue désormais un défi important pour la filière car l'accumulation de macrodéchets issus de la perliculture est devenue un enjeu et une problématique de taille.

2.2. La perliculture : source spécifique de déchets plastiques

En Polynésie française, une source spécifique de macrodéchets plastiques est associée à la perliculture (Andréfouët *et al.*, 2014). En effet, comme toute activité, la perliculture produit des déchets relatifs à ces infrastructures et autres matériels de production. Selon les modalités de gestion de ces déchets, ceux-ci peuvent être stockés, enfouis, brûlés, ou bien réexpédiés. Cependant, par manque de structuration de la filière, aucun dispositif adapté de collecte, traitement et recyclage de ces déchets n'est à ce jour opérationnel. Faute de loi avant 2017, la plupart de ces déchets se sont donc accumulés sur terre comme en mer. Cet amoncellement peut être accidentel (*e.g.* perte liée aux aléas climatiques) ou bien volontaire (comportement peu soucieux de l'environnement). Ainsi, la crise économique de la perle a laissé derrière elle les vestiges d'une activité intensive à la hauteur de l'essor qu'elle a connu dans les années 80. Ce déclin a entraîné la fermeture de nombreuses concessions, parfois laissées à l'abandon avec toutes leurs structures et équipements. En plus de ces fermes abandonnées, certaines concessions en activité délaissent leurs structures inopérationnelles au fond des lagons (Andréfouët *et al.*, 2014). Hormis la ferme perlière faite de bois et de béton, les structures de collectage et d'élevage situées en mer sont quasi-exclusivement constituées de matières plastiques. L'état des lieux réalisé par Andréfouët *et al.* (2014) dans le lagon perlicole de Ahe a révélé d'importantes quantités de cordages, collecteurs, grillages, bouées et liens en nylon. L'ensemble de ces structures abandonnées se sont accumulées d'année en année et viennent intensifier l'accumulation de matières plastiques dans les lagons. En effet, les structures opérationnelles des fermes en activité représentent déjà de grande quantité de plastique à l'échelle des lagons. À titre indicatif, la perliculture (*i.e.* concessions maritimes et zones de collectage) occupe plus de 10% de la surface totale du lagon de Ahe (Andréfouët *et al.*, 2014).

Afin d'évaluer la quantité de déchets immergés, plusieurs missions ont été entreprises (ou sous-traitées) par la DRM au sein des atolls perlicoles de Ahe (DRMM, 2018a), Manihi (DRMM, 2017b), Takaroa (DRMM, 2015), Takapoto (DRMM, 2018b) ou encore dans l'archipel des Gambiers dans le cadre du projet « RESCCUE » (Gaertner-Mazouni *et al.*, 2017). Les résultats

de ces rapports font état d'une pollution plastique importante à l'échelle des lagons. Par exemple, plus de 3700 tonnes de déchets perlicoles immergés ont été estimées pour une surface d'environ 2100 Ha au centre du lagon de Takaroa (DRMM, 2015). Une mission de collecte pilote de ces déchets a d'ailleurs été réalisée *in situ* par la société *« TI AI MOANA* » sous le compte de la DRM en octobre 2017. L'opération a permis de collecter 28 tonnes de déchets (humides) en 23 jours, soulignant l'aspect chronophage et l'impossibilité de pouvoir remédier à la pollution actuelle au vue du caractère onéreux de l'intervention. Pour ces raisons, la loi du Pays n° 2017-16 oblige maintenant les perliculteurs à retirer leurs structures d'élevage du lagon et à nettoyer leurs concessions maritimes. Cependant, cette loi est arrivée tardivement et peu de contrôles sont réalisés du fait de l'insularité de ces territoires. Pourtant, le gisement de matières plastiques est bien présent et risque de perdurer dans le temps constituant ainsi une source potentielle de MP et NP (Andréfouët *et al.*, 2014). En effet, comme décrit précédemment dans le *Chapitre I* (point 2.3), ces matières plastiques (abandonnées et opérationnelles) sont soumises aux facteurs environnementaux, notamment l'ensoleillement qui est souvent intense en Polynésie française. Ainsi, toutes ces structures se fragilisent et se fragmentent en MP et NP sous l'action des facteurs biotiques (*i.e.* biodégradation) et abiotiques (*e.g.* rayons UV, vent, houle) (**Figure 26**). À ce jour, aucun bilan de la contamination en microplastique n'a été fait en Polynésie française. Un simple prélèvement effectué par l'Ifremer en mars 2016 dans la colonne d'eau du lagon de Takaroa a cependant révélé la présence de particules dans un volume de 12 m^3 (données non-publiées). Ce volume relativement faible, a ainsi confirmé ce risque émergeant. L'huître perlière qui présente des taux de filtration très importants est particulièrement concernée par cette menace qui est accentuée par le caractère semi-fermé des lagons qui pourrait favoriser la concentration des MP (Andréfouët *et al.*, 2014). Ainsi, la perliculture est en train de générer son propre risque face à la pollution plastique mais également d'impacter l'écosystème lagonaire. Quelles sont les concentrations en MP dans les lagons perlicoles ? Quelles sont les caractéristiques de ces particules ? Les structures d'élevage en plastique sont-elles toxiques ? Quel est l'impact de ces particules sur la biologie de l'huître perlière ? La ressource et l'économie de la filière sont-elles menacées ? C'est pour tenter de répondre à ces interrogations que le projet « MICROLAG » a vu le jour et s'inscrit dans le cadre de la présente thèse.

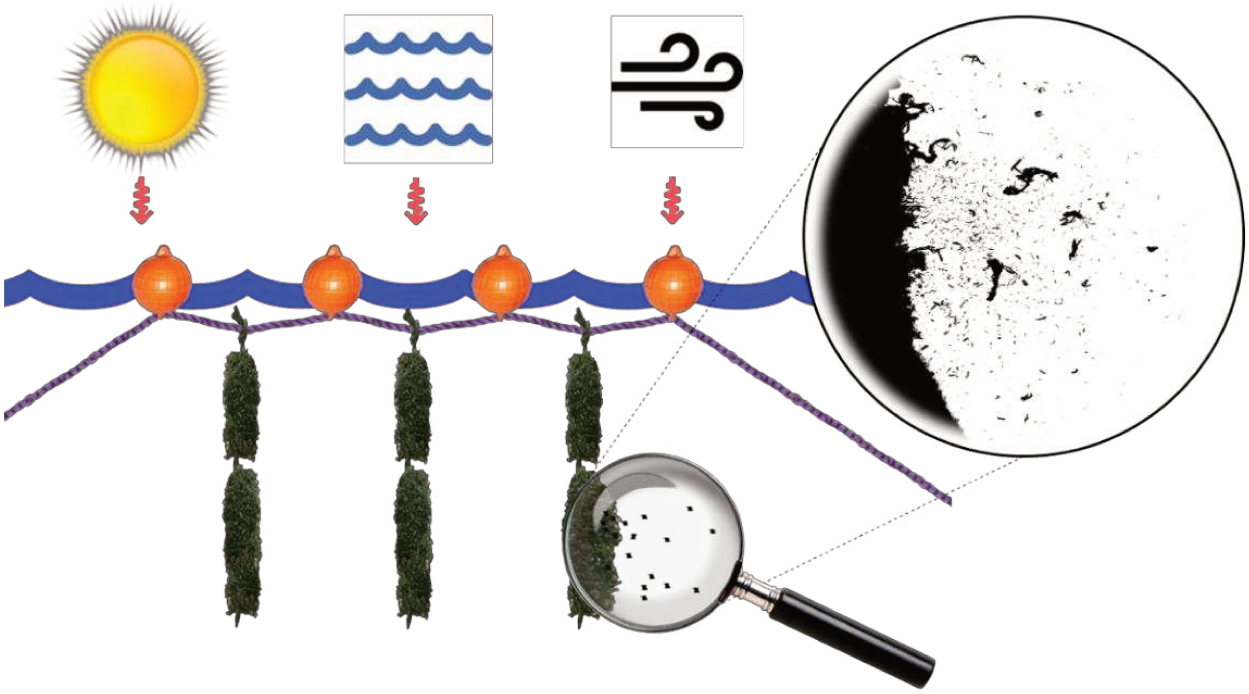


Figure 26. Schéma illustrant le principe de fragmentation des structures d'évelage perlicole soumisent aux facteurs envrironnementaux (*i.e.* ensoleillement, houle, vent). Les structures d'élevage représentées ici correspondent à une ligne de collectage classiquement utilisée ; faite de bouées qui permettent de maintenir une corde proche de la surface (~ 4-6 mètres) où sont suspendus des collecteurs de naissains également appellés « ombrière de collectage ». Cette ombrière, très fine, tricotée autour d'une corde, est suspectée être une source importante de MP dans les lagons perlicoles du fait de sa grande fragilité.

3. Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce projet de thèse s'articulent autour de quatre axes principaux, structurés en trois chapitres dans ce manuscrit. Le premier axe (1) vise à évaluer et caractériser la contamination en MP dans les lagons perlicoles polynésiens (*Chapitre III*). Le second (2) est de maîtriser la méthodologie d'exposition de l'huître perlière à des MP standardisés de laboratoire (*i.e.* microbilles modèles) et d'évaluer les réponses physiologiques et moléculaires (*Chapitre IV*). Le troisième (3) est d'évaluer la toxicité chimique des structures perlicoles en plastique (*Chapitre V*). Enfin, le quatrième (4) est d'évaluer l'impact d'une exposition proche d'une réalité environnementale lagonaire (*i.e.* concentrations *in situ* et MP produits à partir de structures perlicoles) sur l'huître perlière *via* une approche intégrative et fonctionnelle en lien avec la qualité de la perle (*Chapitre V*).

Dans le *Chapire III*, il s'agissait d'établir un premier état de la contamination par les MP des lagons perlicoles, dans l'eau et les tissus d'huîtres perlières en élevage. Des campagnes d'échantillonnage ont donc été réalisées sur cinq sites sélectionnés pour leur histoire et leur activité perlicole importante (Ahe, Manihi, Takaroa, Takapoto et Mangareva). Cette tâche a nécessité la collaboration des Unités de l'Ifremer de Brest : le Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (UMR LEMAR) qui possède l'expertise sur la thématique microplastique et le Laboratoire de Détection, Capteurs et Mesures (LDCM, Unité RDT) qui possède les équipements (spectroscopie Raman et FTIR) pour l'analyse des particules (**Figure 27**).

Dans le *Chapitre IV*, l'objectif était de mettre en œuvre pour la première fois une approche expérimentale en laboratoire et d'exposer *in vivo* les huîtres perlières à des microbilles calibrées classiquement utilisées dans la thématique. Partant d'une concentration maximale en MP déjà testée par nos collègues du LEMAR sur *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2016), cette démarche visait à tester un effet-dose afin de cibler une fenêtre de réponse au stress. Les réponses physiologiques (*i.e.* métabolisme énergétique, reproduction) et moléculaires (*i.e.* réponse transcriptomique) de *P. margaritifera* ont été mesurées et analysées. Les résultats de cette approche préliminaire ont pour but d'appréhender l'expérimentation suivante (*Chapitre VI*) grâce à l'obtention de marqueurs biologiques indicateurs de réponse au stress MP chez *P. margaritifera* (**Figure 27**).

Dans le *Chapitre V*, il s'agissait de tester la toxicité chimique des structures en plastique utilisées en perliculture avant d'étudier l'impact des MP perlicoles sur l'huître perlière. En considérant une voie de non-ingestion et donc les effets induits par la lixiviation de composés chimiques issus de structures neuves et usagées, des embryons d'huître perlière ont été exposés à des lixiviats. Des analyses chimiques ont été réalisées sur les différentes matrices (*i.e.* lixiviats et polymères plastiques) nécessitant la collaboration du Cedre (Brest) pour détecter les contaminants présents et tenter de déceler l'origine de la toxicité observée (**Figure 27**). Ensuite, l'objectif était de réaliser une étude expérimentale *in vivo* simulant le cycle de production d'une perle suivant un scénario environnemental réaliste (*i.e.* type de MP et concentration *in situ*). Les contraintes à la définition d'un tel scénario concernent la quantité et les caractéristiques des particules ingérées par l'huître perlière. Une bonne part de ces contraintes est levée grâce aux résultats obtenus de l'axe 1 du présent projet (*Chapitre III*). Dans un premier temps, un protocole méthodologique a été développé pour produire des MP à partir des structures perlicoles précédemment utilisées pour le test de toxicité. L'impact des MP perlicoles a ensuite été évalué sur *P. margaritifera via* une approche intégrative (*i.e.* au niveau individuel, cellulaire et moléculaire) et fonctionnelle ciblant trois fonctions physiologiques clés en perliculture : la gestion de l'énergie, la reproduction et la biominéralisation. La fonction biominéralisatrice est ciblée car majeure pour la qualité de la perle mais également pour estimer les risques encourus par la filière face à la menace MP (**Figure 27**).

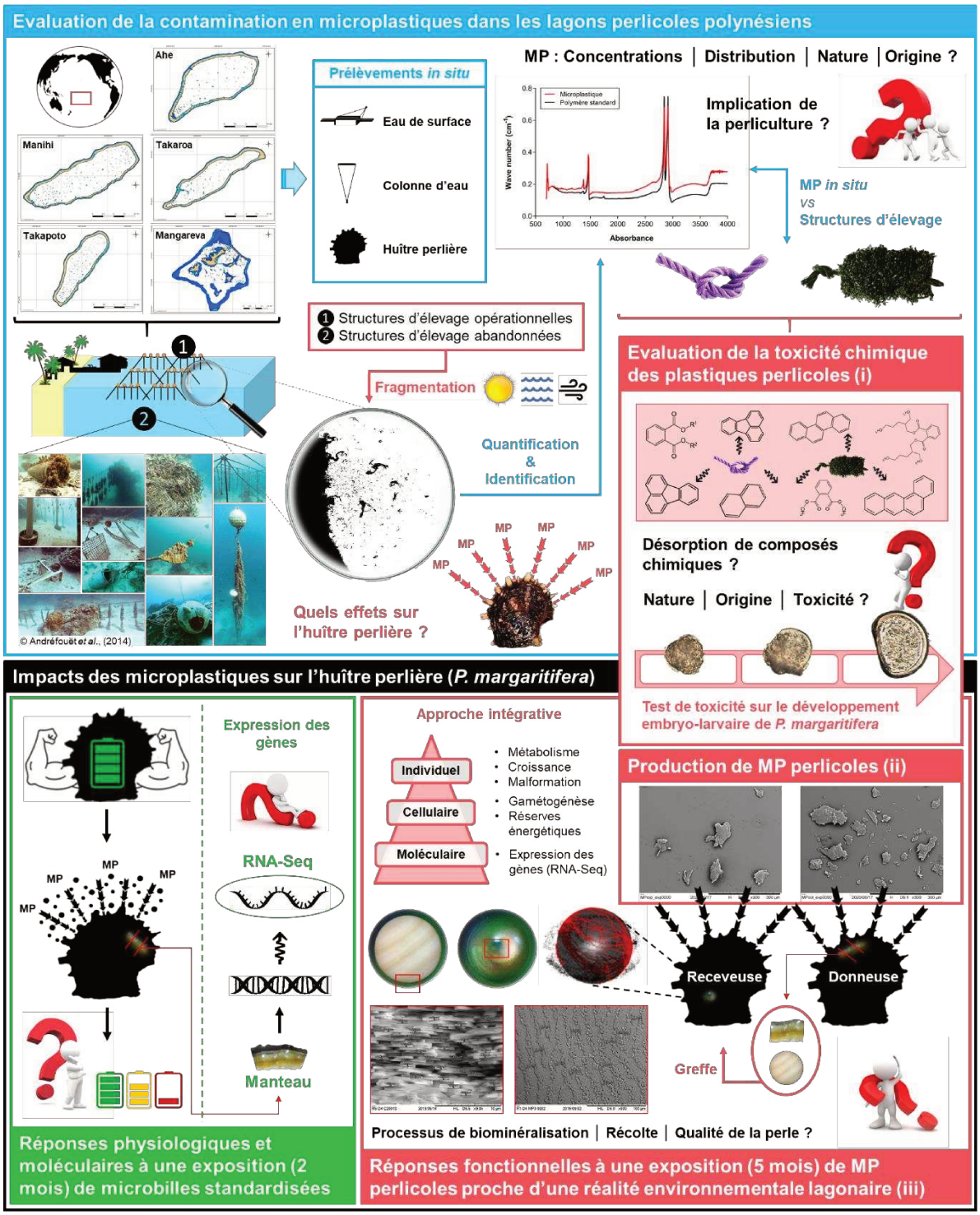


Figure 27. Schéma illustrant les 4 objectifs de la thèse qui visent à (1) évaluer et caractériser la contamination en MP dans les lagons perlicoles polynésiens (Ahe, Manihi, Takaroa, Takapoto et Mangareva) (en bleu ; *Chapitre III*) ; (2) étudier les réponses physiologiques et moléculaires de l'huître perlière suite à une exposition (2 mois) de microbilles standardisées (en vert ; *Chapitre IV*) ; (3) évaluer la toxicité des structures d'élevage en plastique (*i.e.* corde et collecteur) par l'utilisation de lixiviats sur le développement embryo-larvaire de *P. margaritifera* (en rouge (i) ; *Chapitre V*) ; produire des MP à partir de ces structures par la mise en place d'un protocole méthodologique (en rouge (ii) ; *Chapitre V*) puis (4) évaluer l'impact d'une exposition (5 mois) environnementallement pertinente (*i.e.* proche d'une réalité environnementale lagonaire) sur *P. margaritifera* par une approche fonctionnelle (*i.e.* physiologie, reproduction, biominéralisation) et intégrative (*i.e.* aux niveaux moléculaire, cellulaire et individuel) (en rouge (iii) ; *Chapitre V*).

CHAPITRE III

ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DE LA CONTAMINATION EN MICROPLASTIQUES DANS LES LAGONS PERLICOLES POLYNÉSIENS

CHAPITRE III : ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DE LA CONTAMINATION EN MICROPLASTIQUES DANS LES LAGONS PERLICOLES POLYNÉSIENS

1. Préambule

L'évaluation et la caractérisation de la contamination en MP dans les lagons perlicoles est une démarche essentielle pour appréhender la menace MP. L'obtention de données *in situ* va permettre de positionner ces lagons de Polynésie française dans la contamination internationale en comparant les concentrations mesurées avec celles rencontrées dans la littérature. Cela permettra également de prendre la mesure de la contamination de ce type d'environnement, semi-fermé (*i.e.* atolls), avec des activités et pressions anthropiques variées en typologie et intensité. Dans un second temps, ces données permettront de mettre en place un dispositif expérimental visant à exposer *P. margaritifera* à des MP dans des conditions les plus proches possible de la réalité environnementale lagonaire (*Chapitre V* – partie 3). Cette démarche en laboratoire permettra *in fine* d'estimer l'impact des MP sur l'huître perlière et les risques encourus par la filière perlicole et plus largement l'écosystème lagonaire.

Pour ce premier travail, cinq sites ont été sélectionnés par la DRM en raison de leur histoire et de leur niveau d'activité perlicole (**Annexes 1**, **2**, **3**, **4** et **5**). Parmi ces sites, quatre sont des atolls situés dans l'archipel des Tuamotu : Ahe (14°30′S, 146°20′O ; **Figure 28**A), Manihi (14°24'S, 145°57′O ; **Figure 28**B), Takaroa (14°27′S, 144°58′O ; **Figure 28**C) et Takapoto (14°37′S, 145°12′O ; **Figure 28**D). Le cinquième site correspond aux îles Gambier localisées dans l'archipel des Gambier (23°07′S, 134°58′O ; **Figure 28**E) avec pour île principale, Mangareva (23°06′S, 134°57′O). Ainsi, j'ai pu réaliser quatre campagnes d'échantillonnage au cours des deux premières années de thèse :

- La première mission de prélèvements s'est déroulée sur l'atoll de Takaroa du 18 au 21 novembre 2017. Quatre autres membres ont été mobilisés pour ce déplacement dont Arnaud Huvet (Ifremer, UMR LEMAR) et Ika Paul-Pont (CNRS, UMR LEMAR) venus de Métropole pour participer et transmettre leurs connaissances et savoir-faire en matière d'échantillonnage et traitement des échantillons. Ainsi, l'objectif de cette campagne était d'évaluer pour la première fois la contamination MP dans un lagon de Polynésie française, et ce, par la mise au point d'une méthodologie rigoureuse destinée à être reproduite lors des campagnes suivantes. Gabriel Haumani (DRM) et Gilles Le Moullac (Ifremer, UMR EIO) ont également participé à cette mission.

- La seconde mission s'est effectuée en deux temps, du 13 au 16 mars 2018 sur l'atoll de Manihi, puis du 16 au 20 mars 2018 sur celui de Ahe. Les membres participant à cette mission étaient Anne-Laure Cassone (CNRS, UMR LEMAR), Virgile Quillien (Ifremer, UMR EIO) et Marcel Matarere (Ifremer, IMA).
- L'atool fermé de Takapoto a fait l'objet d'une troisième mission réalisée du 30 mars au 6 avril 2019 avec pour membre Jérémy Le Luyer (Ifremer, UMR EIO), Claude Soyez (Ifremer, UMR EIO) et Gabriel Haumani. Cependant, une fois rapatriée par bateau au quai de Papeete, la malle contenant les échantillons a subi une chute de plusieurs mètres au moment du débarquement, conduisant à la perte totale des échantillons. Cette mission a été reconduite en mon absence par Alain Lo Yat (Ifremer, UMR EIO), Claude Soyez et Louis Coste (Ifremer, UMR EIO) du 01 au 08 février 2020.
- Enfin, la quatrième mission s'est portée sur les îles Gambier du 18 au 25 juin 2019 avec la participation de Lucie Morvan (stagiaire M2, Ifremer, UMR EIO) et Claude Soyez.

Pour chaque site d'étude, des prélèvements d'eau horizontaux (surface) et verticaux (colonne d'eau) ont été réalisés, ainsi que des prélèvements d'huîtres perlières obtenues auprès des perliculteurs (**Figure 28**). La méthodologie de prélèvement d'eau de surface a été harmonisée sur celle préconisée dans le cadre de la DCSMM par l'utilisation d'un filet manta de maille 335 µm, puis doublée d'un échantillonnage sur maille plus fine à 80 µm pour atteindre les niveaux de contamination correspondant à ce qui est ingéré par l'huître perlière (*i.e.* 2-200 µm). Pour la même raison, et du fait qu'il s'agisse du compartiment écologique où l'huître perlière est élevée (*i.e.* entre 5 et 6 m), des prélèvements dans la colonne d'eau ont également été réalisés avec un filet à plancton de maille 40 µm. Ces trois prélèvements ont été effectués dans chacune des zones d'échantillonnage réparties de manière homogène à l'échelle des lagons de sorte à pouvoir évaluer la distribution et les variations spatiales des concentrations en MP (**Figure 28**). Des prélèvements de surface dans les passes en courant entrant et sortant ont également été réalisés quand cela était possible. Un total de 31 échantillons d'eau par site a été prélevé sur Ahe, Manihi et Takaroa, 30 pour Takapoto et 32 pour les îles Gambier. En fonction des sites d'étude, 30 huîtres ont été prélevées auprès d'une ou deux fermes perlières (**Figure 28**). Les données GPS pour chacune des zones d'échantillonnage et de prélèvements d'huîtres sont précisées dans l'**Annexe 6**. À l'occasion de la première mission sur Takaroa, plusieurs débris plastiques ont pu être collectés sur les plages et sont présentés **Figure 29**. Cette démarche a permis d'obtenir un référentiel des objets/macroplastiques retrouvés sous forme de déchets utile pour identifier les sources potentielles de MP *in situ* mais aussi pour les approches expérimentales futures destinées à tester des broyages pour la production de MP expérimentaux (*Chapitre V*, article 5).

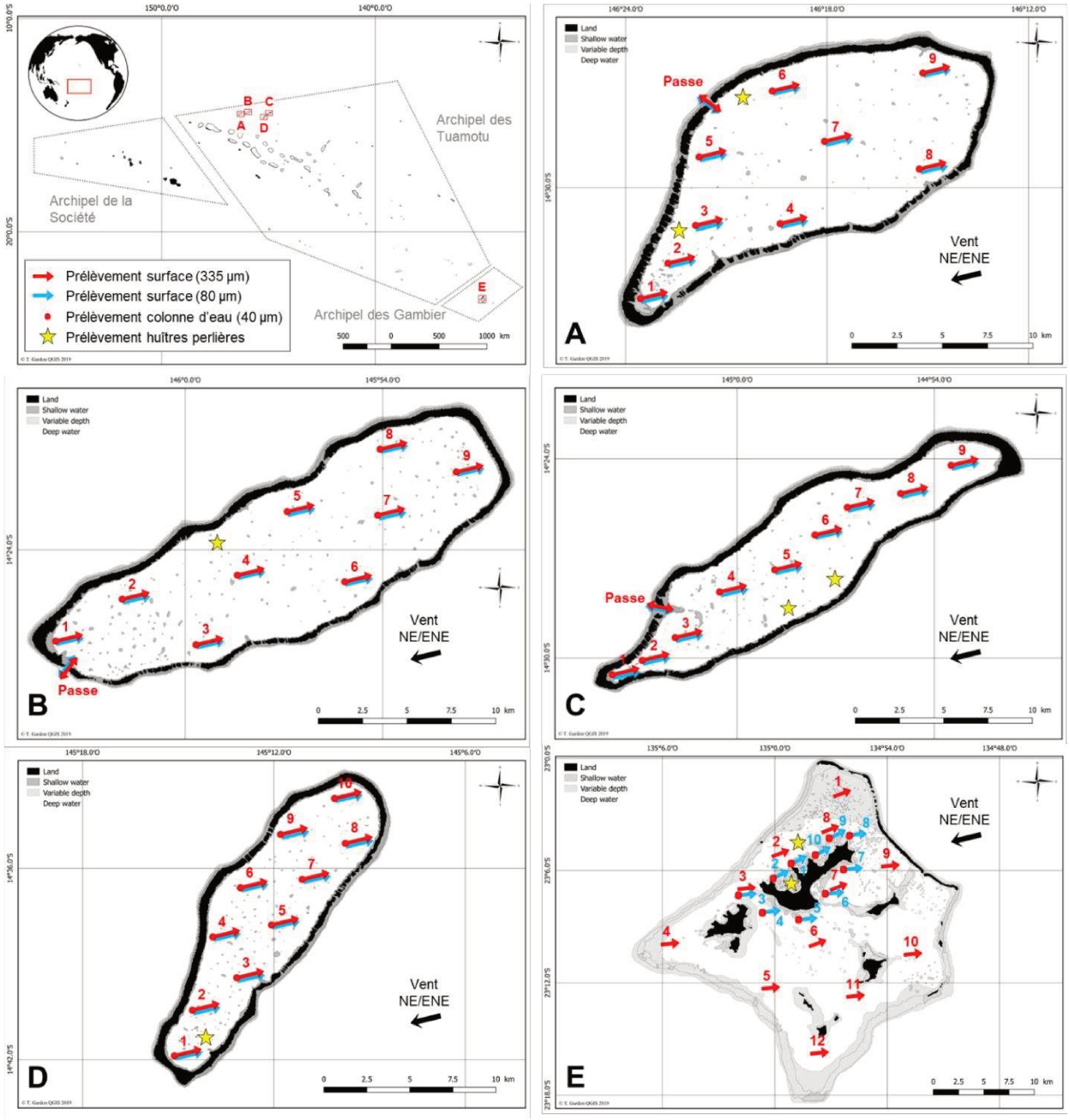


Figure 28. Répartition des zones d'échantillonnage dans les lagons perlicoles sélectionnés pour l'évaluation et la caractérisation de la contamination en microplastiques. Ahe (**A**), Manihi (**B**), Takaroa (**C**) et Takapoto (**D**) sont localisés dans l'archipel des Tuamotu et les îles Gambier (**E**) sont localisées dans l'archipel des Gambier. Pour chaque zone, trois prélèvements d'eau sont effectués : deux prélèvements en surface à 335 et 80 µm et un prélèvement dans la colonne d'eau à 40 µm. En tout, 9 zones ont été établies pour les atolls de Ahe, Manihi et Takaroa ainsi que leur passe échantillonnée en surface uniquement. Takapoto étant un atoll fermé (absence de passe), une dixième zone dans le lagon a été établie. Pour les îles Gambier, les prélèvements en surface à 335 µm ont été réalisés de sorte à couvrir le plus possible la superficie du territoire. Les prélèvements en surface à 80 µm et dans la colonne d'eau à 40 µm ont quant à eux été réalisés au niveau des zones à forte activité perlicole, autour de l'île principale de Mangareva. Trente huîtres ont été prélevées auprès d'une seule ferme perlière concernant Manihi et Takapoto, et réparties entre 2 fermes (15 individus par fermes) pour l'atoll de Ahe, Takaroa et les îles Gambier. Les cartes ont été réalisées grâce aux données cartographiques tirées de Andréfouët *et al.* (2006) et traitées grâce au logiciel QGIS v2.18.24.



Figure 29. Panel de photographies illustrant les débris plastiques collectés sur les plages de Takaroa. *Crédit : Ika Paul-Pont.*

La quantité importante d'échantillons s'est avérée être un frein dans la chaîne d'analyse car leur traitement et l'identification des particules est extrêmement chronophage pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est important de noter que les prélèvements d'eau en surface représentent un volume d'eau filtré de l'ordre de 150 m^3, ce qui conduit à la capture d'une grande quantité de matières organiques (*e.g.* algues, feuilles, alevins, crustacés ; **Figure 30**). Ainsi, un gros travail de tri manuel a été entrepris pour dégrossir l'échantillon de ces macro-débris avant d'entamer la phase de digestion basique (KOH) puis oxydative (H_2O_2) de la matière organique (MO). Cependant, le protocole de digestion de la MO appliqué pour « purifier » l'échantillon de toutes traces organiques avant filtration n'est pas apparu optimal. En effet, le traitement au KOH puis H_2O_2 n'a eu quasiment aucune action sur les cuticules de crustacés (*e.g.* copépodes, mysidae) qui rendent la quantification et l'identification des particules difficiles en raison de leur enchevêtrement dans cette MO résiduelle (**Figure 31**), et ce pour certains échantillons très riches en crustacés (notamment ceux issus des prélèvements à 80 µm). Ces cuticules sont faites de chitine, un polysaccharide très difficilement digérable du fait de sa grande résistance aux traitements chimiques (Cottrell *et al.*, 1999 ; Cole *et al.*, 2015b). Bien qu'il soit possible de se

procurer de la chitinase commerciale pour digérer cette matrice organique, son coût est beaucoup trop élevé considérant le nombre et le volume d'échantillons à traiter. Ce verrou méthodologique a donc fait l'objet d'un stage visant à développer une piste prometteuse au regard des propriétés chitinolytiques de certaines bactéries marines qui pourraient être ensemencées directement dans les échantillons. Éloïse Courbin, en formation d'assistant ingénieur en biologie-biochimie-biotechnologie (Université Catholique de Lyon), a donc travaillé sur l'activité chitinolytique de plusieurs souches *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* pour tenter d'isoler la plus active. Les résultats de ce travail ont permis d'isoler la souche *Pseudoalteromonas flavipulchra* présentant la meilleure activité chitinolytique parmi les 23 isolats criblés sur gélose Zobell-Agar-Chitine. L'activité chitinolytique de la bactérie s'est également révélée efficace sur la chitine en milieu Zobell liquide. Ces premiers tests ont permis d'entrouvrir des voies d'amélioration du protocole de digestion actuel mais n'ont pas pu être développés davantage sur les échantillons *in situ*. C'est pourquoi je ne présenterai pas plus en détails ce travail dans mon manuscrit de thèse. Des travaux supplémentaires sont requis pour développer cette approche qui pourrait s'avérer bénéfique pour la communauté scientifique. En effet, la présence de chitine reste un problème de taille dans le suivi de la contamination microplastique pour certains types d'échantillons (Cole *et al.*, 2015b).

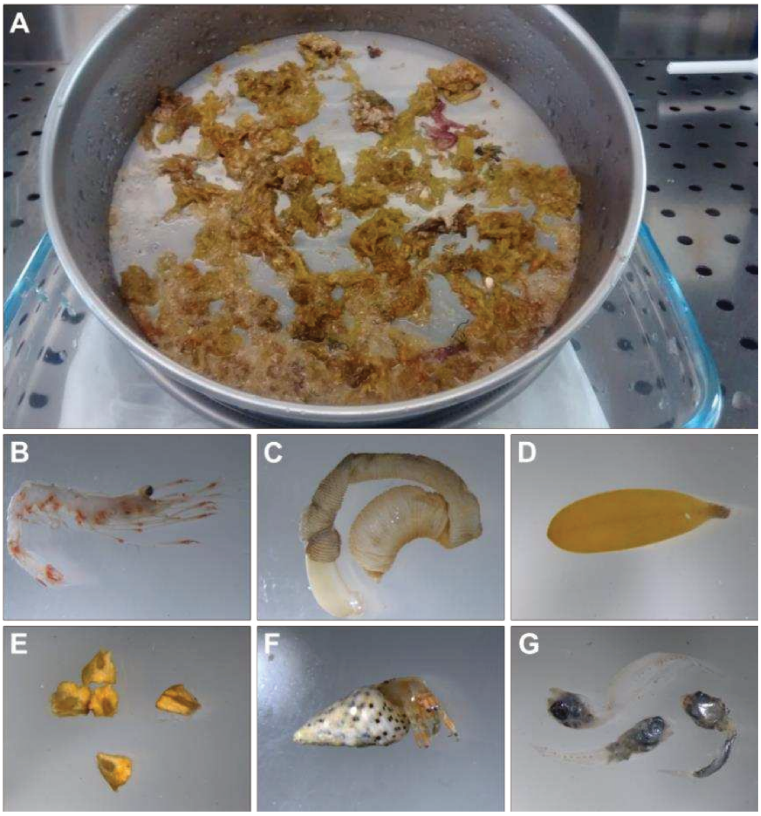


Figure 30. Exemples de matières organiques retrouvées dans un échantillon d'eau de surface. L'échantillon est composé entre autres d'algues marines (**A**), de crustacés (**B**), de vers marins (**C**), de feuilles (**D**), de graines (**E**), de bernard l'hermite (**F**) et d'alevins (**G**).

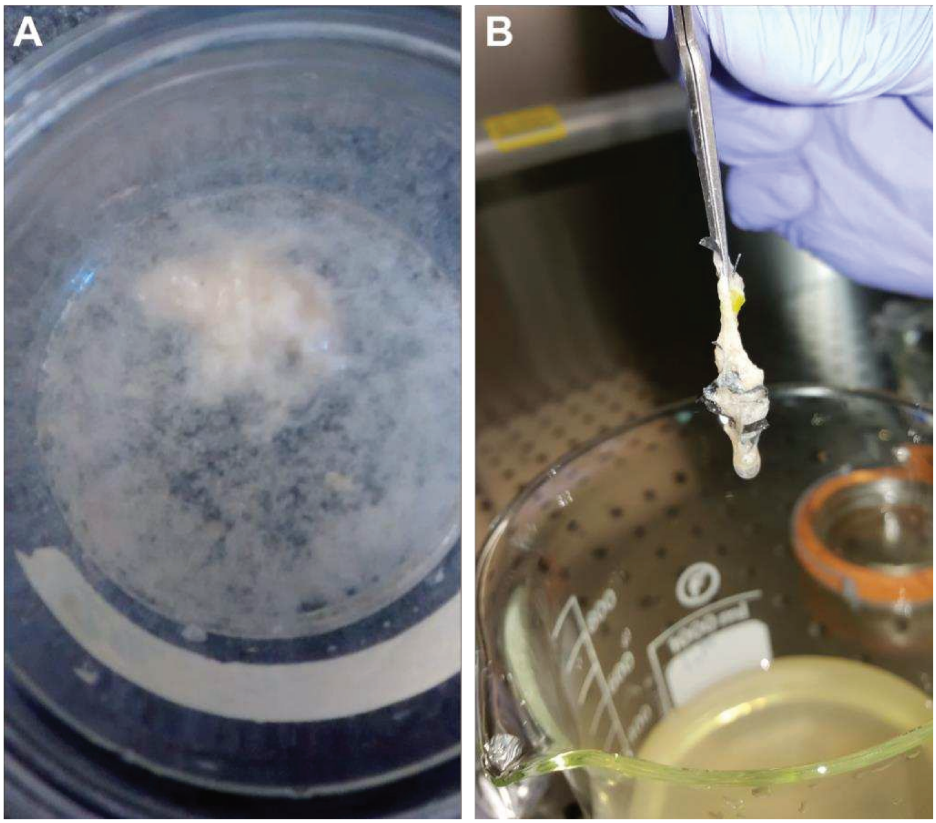


Figure 31. Chitine résiduelle retrouvée à la suite du protocole de digestion. Les photographies illustrent un amas de chitine à la surface de l'échantillon post-digestion (**A**) et contenant des débris synthétiques enchevêtrés dans cette matrice organique (**B**).

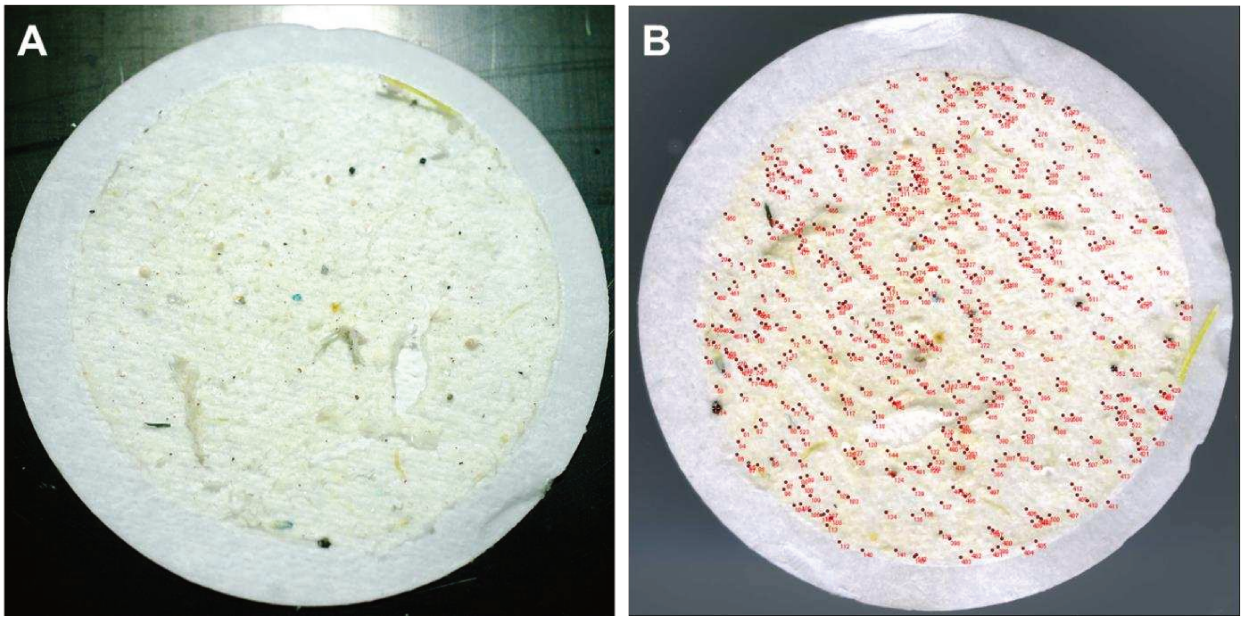


Figure 32. Échantillon digéré, filtré puis scanné à haute résolution (**A**) pour la quantification des particules *via* le logiciel imageJ (**B**).

L'étape de digestion a ensuite été suivie d'une phase de filtration sur filtre. Ce dernier est alors scanné à haute résolution afin de quantifier les particules présentes (**Figure 32**). Cette seconde étape demande également du temps puisque les particules sont pointées une à une grâce au logiciel imageJ (**Figure 33**). Une fois les particules comptabilisées, les filtres ont été expédiés en Métropole à l'Ifremer de Brest, au Laboratoire Détection Capteurs et Mesures (LDCM) chargé d'identifier les particules par spectroscopie FTIR. Là encore, ce travail n'est pas automatisé puisque l'opérateur doit saisir les particules une à une à l'aide d'une pince ultra-fine et d'un microscope. Ce travail a été pris en charge par un CDD, Léna Thomas. Pour ces raisons et tenant compte des délais impartis, des choix stratégiques ont été effectués. Les prélèvements de surface à 80 µm ont été écartés de l'analyse au profit des prélèvements de surface à 335 µm, qui correspondent au standard international, ainsi qu'aux prélèvements verticaux (40 µm), qui présentent un intérêt écologique pour l'élevage de l'huître perlière. Ainsi, la chaîne d'analyse a pu être conduite en totalité pour l'ensemble de ces échantillons concernant les lagons de Ahe, Manihi et Takaroa ainsi que pour les échantillons d'huîtres perlières. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une soumission (article 1) dans la revue scientifique *Environment International* (facteur d'impact 2019 : 7.577) :

Microplastics contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia

Tony Gardon [a, *], Maria El Rakwe [b], Ika Paul-Pont [c], Jérémy Le Luyer [a], Léna Thomas [b], Enora Prado [b], Kada Boukerma [b], Anne-Laure Cassone [c], Virgile Quillien [a, c], Claude Soyez [a], Louis Costes [a], Margaux Crusot [d], Catherine Dreano [b], Arnaud Huvet [c] and Gilles Le Moullac [a]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Ifremer, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM), Centre Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280, Plouzané, France

[c] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

[d] Univ Polynésie française, Ifremer, ILM, IRD, EIO, F-98702 Faa'a, Tahiti, Polynésie française, France

2. Article 1 (soumis) – *Environment International*

Microplastics contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia

Tony Gardon [a, *], Maria El Rakwe [b], Ika Paul-Pont [c], Jérémy Le Luyer [a], Léna Thomas [b], Enora Prado [b], Kada Boukerma [b], Anne-Laure Cassone [c], Virgile Quillien [a, c], Claude Soyez [a], Louis Costes [a], Margaux Crusot [d], Catherine Dreano [b], Arnaud Huvet [c] and Gilles Le Moullac [a]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Ifremer, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM), Centre Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280, Plouzané, France

[c] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

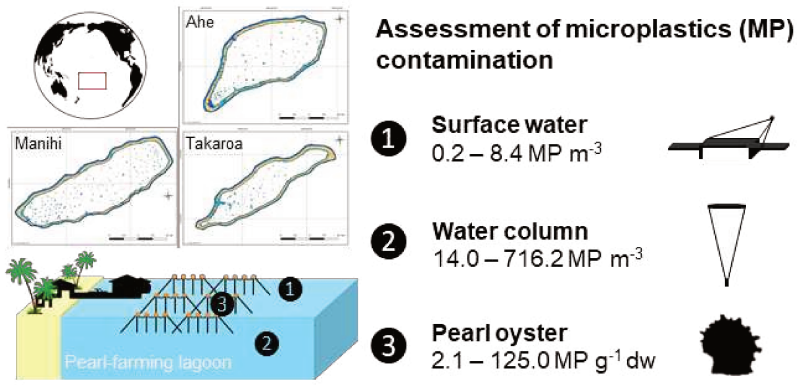
[d] Univ Polynésie française, Ifremer, ILM, IRD, EIO, F-98702 Faa'a, Tahiti, Polynésie française, France Polynésie française, France

* *Corresponding author*

Highlights

- Widespread contamination by microplastics (MP) is observed in pearl-farming lagoons.
- The water column is a highly contaminated compartment.
- Dominant MP in seawater are 20-200 µm, fragment-shaped polyethylene.
- Dominant size classes and polymers are similar between seawater and pearl oysters.
- Pearl farming is likely implicated in the MP contamination of Polynesian lagoons.

Graphical abstract



Abstract

Pearl farming (*Pinctada margaritifera*) is the second most important source of income in French Polynesia (FP) through the trade of pearls and mother-of-pearl. However, tropical lagoons are fragile ecosystems, particularly with regard to anthropic pressures like plastic pollution, which threaten marine life and the pearl oyster-related economy. Recent research has shown that small plastic particles, also known as "microplastics" (MP), have a significant impact on pearl oyster physiology, although we clearly still lack information on *in situ* contamination. Here, we investigated the spatial distribution of MP and concentrations in surface water (manta trawl > 335 µm), water column (planktonic net > 40 µm) and cultivated pearl oysters from three pearl-farming atolls (Ahe, Manihi and Takaroa) of the Tuamotu archipelago in French Polynesia. Microplastics were categorized by their size class, shape, colour and polymer type identified using FTIR spectroscopy. Widespread MP contamination was observed in every study site, with high contamination in the water column (MP concentration ranged from 0.2 to 8.4 MP m^{-3} in surface water, 14.0 to 716.2 MP m^{-3} in the water column and 2.1 to 125.0 MP g^{-1} dry weight in pearl oyster). This result highlights the need to study the vertical distribution of MP in the water column, especially as this compartment where pearl oysters are reared, has been underestimated by recent studies. Dominance of small (20-200 µm) and fragment-shaped (> 70%) MP was observed throughout the samples regardless of sampling site, suggesting that they result from the breakdown of larger plastic debris. The most abundant polymer type was polyethylene (PE) in surface water (34-39%), water column (24-32%), while in pearl oyster, polypropylene (PP, 14-20%) and PE were more evenly distributed (9-21%). The most common MP identified as black-grey PE and PP matches the polymer and colour of ropes and collectors suggesting a pearl farming origin. The main goal is now to certify the contamination sources, this will help decision-making and the search for solutions to reduce plastic pollution.

Keywords

Microplastics | Concentrations | Atolls | Surface water | Water column | Pearl oyster

Introduction

Plastic pollution and its environmental impacts have aroused intense public interest due growing coverage in both scientific and popular publications driven by large-scale policy recommendations. Since the plastics industry first flourished in the 1950s, global plastic production has steadily increased, reaching 359 million tons in 2018 (PlasticsEurope, 2019). However, poor management of plastic waste means that it is frequently washed into the oceans,

where it accumulates and disperses on a global scale, showing a great resilience (Thompson *et al.*, 2004; Barnes *et al.*, 2009). Studies estimate that the amount of plastic floating on the sea surface is between 93,000 and 236,000 tons, representing approximately 5,000 to 50,000 billion fragments, 92% of which are microparticles of plastic called "microplastics" (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; Van Sebille *et al.*, 2015; Pabortsava and Lampitt, 2020). These microplastics (MP), defined as items < 5 mm diameter, can enter the marine environment by several pathways (reviewed in Andrady, 2011). The majority of MP found in the oceans are secondary MP (Lassen *et al.*, 2015) produced by the fragmentation of larger plastic debris under a combination of environmental factors (physical, chemical and biological processes) (Andrady, 2011). Primary MP, in contrast, are those directly released into the environment as micro-sized particles (*e.g.* synthetic fibres, microbeads from the cosmetic industry, pre-production pellets or tire particles) (Boucher and Friot, 2017).

Microplastics have been reported in all major oceans and seas including the Pacific (Eriksen *et al.*, 2013; Desforges *et al.*, 2014), Atlantic (Ivar do Sul and Costa, 2014; Kanhai *et al.*, 2017) and Indian Oceans (Imhof *et al.*, 2017), as well as the Southern Ocean (Isobe *et al.*, 2017), Arctic polar waters (Lusher *et al.*, 2015; Kanhai *et al.*, 2018), Antarctica (Munari *et al.*, 2017), and the Mediterranean (Collignon *et al.*, 2012; de Haan *et al.*, 2019) and North Seas (Dubaish and Liebezeit, 2013; Tamminga *et al.*, 2018). They have been found everywhere, from populated coastal environments (Isobe *et al.*, 2015; Frère *et al.*, 2017; Di Mauro *et al.*, 2017; Abayomi *et al.*, 2017) to the most remote areas (Obbard, 2018; Peeken *et al.*, 2018). Their ubiquitous nature in all environmental matrices, from surface water (Eriksen *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2015), down through the water column (Lattin *et al.*, 2004) to the sediments (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013; Woodall *et al.*, 2014), including in marine biota (Murray and Cowie, 2011; Foekema *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2015), and their small sizes make them easily taken up by a wide range of organisms (Galloway *et al.*, 2017).

In French Polynesia (FP), pearl farming is the second most important economic activity, based on the trade of pearl and mother-of-pearl. It also contributes to the social and environmental landscape of the territory by being widespread across 23 islands and atoll lagoons. However, pearl farming is associated with a specific source of plastic pollution. The inventory carried out by Andréfouët *et al.* (2014) in the atoll lagoon of Ahe (FP) revealed thousands of tons of plastic pearl-farming gear (*e.g.* collectors, ropes, buoys or nylon ties). Rearing structures and equipment of these types (both derelict and operational) are accumulating over time in pearl-farming lagoons. They may fragment into smaller particles, which then add to MP entering the lagoons from other anthropogenic pressures and from the South Pacific subtropical gyre (Eriksen *et al.*, 2013; Luna-Jorquera *et al.*, 2019). This situation is worsened by the semi-enclosed environments of some of these lagoons, which could favour MP accumulation (Andréfouët *et al.*, 2014). Pearl farming could thus be causing a risk to itself through plastic pollution, with a potential

impact of MP on the pearl oyster *P. margaritifera*. MP could therefore severely impact the fishery- and aquaculture-related economy by altering livestock and potentially human health (Lusher *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2018). This is particularly true for bivalve aquaculture since many farmed species are suspension filter-feeding organisms, directly exposed to any MP present in the water column (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). For instance, risks were only addressed experimentally: exposure using polystyrene microbeads (6 and 10 µm) has already demonstrated a dose-dependent effect on the energy balance (Gardon *et al.*, 2018) and dose-specific transcriptomic disruption to gene expression (Gardon *et al.*, 2020b) in *P. margaritifera*. However, the concentrations tested were not ecologically relevant since no environmental surveys had been performed in pearl farming lagoons. To date, only one study has demonstrated the presence of MP in French Polynesia waters, using a 50 µm-plankton net in front of a public beach in Moorea, where they reached 0.74 MP m^{-2} (Connors, 2017). There was, therefore, a strong need to evaluate and characterize MP pollution in pearl-farming lagoons.

The aim of the present study was to evaluate MP contamination in pearl-farming atoll lagoons of French Polynesia. We investigated MP concentration, composition and spatial distribution in surface water and the water column, as well as in the tissue of cultivated pearl-oysters. Our study addressed two main aspects: (1) the concentrations and distributions of MP in the compartments investigated; (2) the nature and proportions of the synthetic polymers encountered whether we could relate this to specific contamination sources. The data produced are ground-breaking data for decision making for government policies to assess and anticipate this emerging risk for pearl-farming sustainability.

Materials and methods

Study sites

Microplastics contamination was evaluated in three atoll lagoons (Ahe, Manihi and Takaroa) of Tuamotu archipelago (18° 47′ S, 141° 35′ W, FP), located to the north-east of Tahiti island (17° 40′ S, 149° 28′ W, FP). Sampling campaigns were carried out from 18 to 21 November 2017 in Takaroa, and in March 2018 in Manihi (13 to 16 March) and Ahe (17 to 20 March) atolls. These study sites were chosen because of their pearl-farming history and activity, and marked by a low tourist activity, estimated at 3,500 (Takaroa), 4,000 (Manihi) and 4,500 (Ahe) people in transit per year. Pearl-farming activity was relatively the same in the study sites except for Takaroa, where the scale of this activity has declined since 2016 due to harmful algal bloom events that led to the death of many cultured oysters (Rodier *et al.*, 2019). In each location, specific areas are devoted to pearl-farming activities (*i.e.* maritime concessions for pearl oyster rearing) with additional collecting stations authorized by the government. Collecting stations are composed of

spat collectors placed in specific zones of the atoll corresponding to optimal locations for spat settlement, notably based on hydrodynamic conditions (Thomas *et al.*, 2016).

Ahe (14° 30′ S, 146° 20′ W; **Figure 1**A), Manihi (14° 24' S, 145° 57′ W; **Figure 1**B) and Takaroa (14° 27′ S, 144° 58′ W; **Figure 1**C) are semi-enclosed marine environments with 12, 13 and 20 km^2 of emerged land populated by 491, 650 and 674 inhabitants, respectively. The lagoons of Ahe (145 km^2), Manihi (165 km^2) and Takaroa (89 km^2) are each reached by a unique pass, which plays an important role in the water renewal, with about 34, 130 and 76 days of residence time, respectively (Pagès *et al.*, 2001). Authorized surface areas for pearl-farming marine concessions are 831, 413 and 392 ha in Ahe, Manihi and Takaroa, representing 5.6, 2.5 and 4.4% of the total lagoon areas, respectively. Additionally, 1,536, 498 and 887 collecting stations are authorized in Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (DRMM, 2017). A summary table of the study site characteristics and main results of the present study is given in the Supplementary Information file (**Table S1**).

Seawater sampling

Nine sampling stations were established in each lagoon, spread over the whole area. Vertical (water column) and horizontal (surface water) sampling of seawater was performed at each station. Two additional surface water samples were taken in the pass at each study site under conditions of inward and outward current flow (**Figure 1**).

To study MP occurrence in the water column, a planktonic net with a 40 µm mesh size and a circular opening of 0.4 m diameter was used. The net was weighted using a 1 kg lead weight in order to vertically sample from a vessel. The depth was measured with a graduated rope connected to the net. Once brought back on board, the net was thoroughly externally rinsed with *in situ* seawater to concentrate debris at the end of the net before purging the residual seawater into a hermetic glass jar. The top 20 cm of the sea surface microlayer was then sampled using a standard manta trawl with a 335 µm mesh net and a rectangular net opening of 0.6 × 0.16 m, pulled at an average speed of two knots for 20 min. Sampling was systematically undertaken against the wind. A flow meter (model 23.091, KC Denmark Research Equipment and model 2030, General Oceanics) was used to evaluate the volume of seawater filtered through the net. After sampling, the net was thoroughly rinsed with *in situ* seawater to concentrate debris in the collector screwed at the end of the net. The sample contained in the collector was then transferred into a hermetic glass jar. All samples were stored at –20°C until treatment and analysis in the laboratory. Wind speed conditions encountered during seawater sampling are detailed for each study site in **Table S1**.

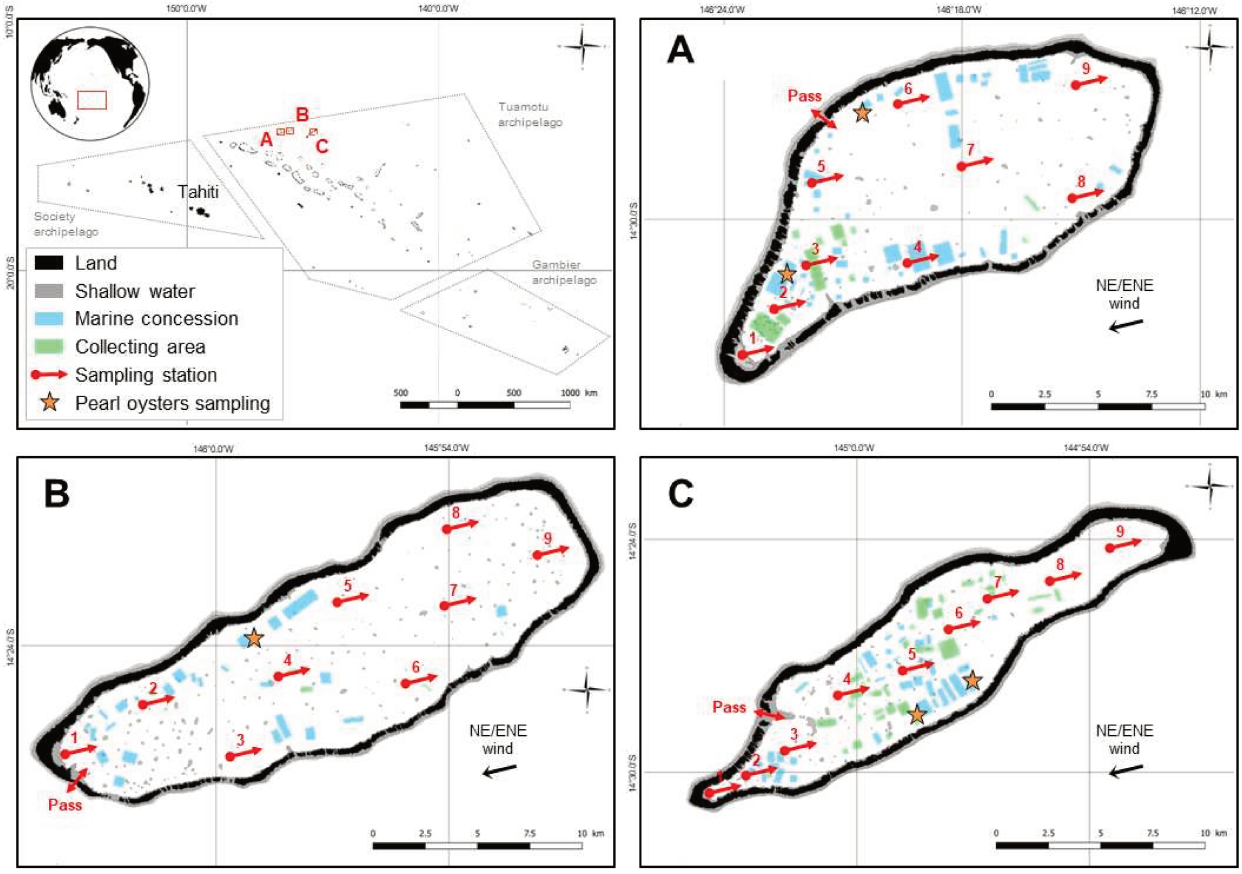


Figure 1. Study site maps indicating pearl-farming activity and sampling locations in Ahe (**A**) Manihi (**B**) and Takaroa (**C**) atolls. Colours indicate land (black), shallow water (grey), pearl-farming marine concessions (blue) and spat-collecting areas (green). Red arrows and orange stars indicate sampling stations for seawater and pearl oysters, respectively. For an interpretation of the reference colours, please refer to the web version of this article.

Pearl oyster sampling

In Ahe and Takaroa, a total of 30 pearl oysters were sampled across two livestock rearing areas of different pearl-farmers (15 individuals per farm). In Manihi, 30 oysters were provided by one pearl farm (**Figure 1**). Biometric measurements were realized before dissection and individual packaging of the flesh in zip-lock bags. All samples were stored at –20 °C until treatment and analysis in the laboratory.

Sample treatment and analysis

Particle isolation and quantification

Samples were processed in laboratory conditions under an extractor hood. Water samples were first cleaned of their macro-sized organic matter (*e.g.* leaves, seeds, macroalgae, fry) on

150-µm (surface water samples) and 30-µm (water column samples) mesh sieves. Macro-debris were rinsed with 1.2-µm filtered distilled water before being removed to facilitate the digestion step. The digestion of organic matter was performed according to the protocol of Dehaut *et al.* (2016), adapted by Foekema *et al.* (2013). Water samples were re-suspended in a 10% potassium hydroxide (KOH) solution in their respective hermetic glass jars with a stir bar and placed on a heating magnetic stirrer at 60°C and 300 rpm for 24 h. Pearl oyster samples were rinsed and also placed in individual hermetic glass jars wherein they underwent the same digestion process in 100 ml of 10% KOH solution. After the first digestion step, samples were sieved on a 150 µm (surface water samples), 30 µm (water column samples), or 20 µm (pearl oyster samples) mesh sieve and thoroughly rinsed with filtered distilled water before re-suspension in a 30% hydrogen peroxide (H_2O_2) solution. The second digestion was performed at 50°C and 300 rpm for 2 h before filtration on a GF/C filter (1.2 µm porosity, Ø 47 mm, Whatman®) previously burned at 450°C. The filter was rinsed with filtered distilled water, then placed in a Petri dish for drying at room temperature before particle quantification. Filters were scanned using a high-resolution scanner (Epson Perfection 4990 PHOTO) at 12,800 dpi for numerical particle quantification with Image J software v.1.48. All of the particles (organic and inorganic) present on the filter were manually selected and quantified by dissociating fragments from fibres.

Size distribution

Particle size analysis was performed with Image J software v1.52, using high-resolution scans of the filters. We focused on the cleaner filters (n = 4 per study site) for the samples for which the digestion step of organic matter had been the most efficient (*i.e.* no visible organic traces). Particle size was measured by setting a scale based on a known distance in millimetres, converted into pixels. Contrast and threshold were adjusted in order to get as close as possible to the original picture. Particles were then fully analysed to obtain the width and the height of each in millimetres (mm). Width and height data were merged and classified according five size classes: 0.020-0.200, 0.200-0.335, 0.335-1, 1-5 and > 5 mm. Filters were analysed individually, then collected data were pooled from all study sites and treated separately according to sample type (*i.e.* surface water, water column and pearl oyster).

Particles characterisation by Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy

A subset of particles was selected for FTIR analysis at Ifremer, Brest (France) (see section 2.6). FTIR microscopy measurements were performed with a Thermo IS50 infrared spectrometer coupled to an infrared Thermo Nicolet™ Continuum™ microscope with a 15x IR objective and a mercury cadmium telluride (MCT) single element detector cooled with liquid nitrogen. The spectral resolution was 4 cm^{-1}. In this method, colour of selected particles was monitored and

single particles were then placed in a diamond micro-compression cell, one by one, and flattened between the two diamond anvils of a SPECAC® micro compression cell (Eurolabo, Paris, France). To obtain reliable results, comparison with a reference spectra database is absolutely necessary to unambiguously identify polymer type. Polymer identification was, therefore, made using the Thermo IR polymer database, with a 75% accuracy. The rayon polymer, which is often included in the classification of MP found in the marine environment, was excluded from this study, however. Indeed, FTIR-based studies showed that 30% of suspected rayon fibres turned out to be cellulose, which is considered a natural product. Since cellulose and the semi-synthetic polymer rayon have almost identical FTIR spectra (Lusher *et al.*, 2014), we left this particular compound out of our study (Peeken *et al.*, 2018).

Multivariate analysis

To confirm the nature of the identified particles and analyse all spectra, we used chemometrics. The first step of this approach is to apply a spectral data pre-processing (Whittaker baseline correction) followed by a normalization method so that all the spectra would be at the same intensity, which facilitates the comparison with the database. The second step is to extract the meaningful information to identify the sample. Spectra were analysed using independent component analysis (ICA). Independent component analysis is a statistical and computational technique for extracting source signals from mixtures. The observed signals are considered as weighted sums of pure source signals, the weights being proportional to the contribution of the corresponding pure signals to each mixture (Hyvärinen and Oja, 2000; Wang *et al.*, 2008). The objective of ICA is, therefore, to search for the least Gaussian possible sources, *i.e.* the most independent (Rutledge and Jouan-Rimbaud Bouveresse, 2013). Data treatment was done using MATLAB R2017a (The Math Works, Natick, USA).

Quality control: contamination assessment and prevention

To account for possible contaminations in the sample preparation process, background contamination from airborne particles during sampling was assessed by conducting field quality controls. To create this control for both surface water and water column sampling, an empty glass jar was left open on the vessel during sampling. Three quality controls were performed *in situ* for each study site (n = 9). In the laboratory, all equipment used was made of glass or stainless steel and thoroughly rinsed with filtered (1.2 µm) distilled water. Operators wore cotton lab coats at all times and all surfaces were cleaned with filtered (1.2 µm) 70% ethanol. As in the case of field quality controls, similar procedural blanks were also run in the lab at all steps of sample processing (n = 27). KOH and H_2O_2 solutions used for sample treatment were also filtered on a 1.2 µm GF/C filter. Each field quality control and procedural blank jar were then rinsed with filtered

distilled water that was filtered on a GF/C filter (1.2 µm porosity, Ø 47 mm, Whatman®) for quantification of particle contamination.

Statistical approach and analyses

We used the statistical analysis proposed by Kedzierski *et al.* (2019) to define the sub-sampling procedure for conducting a representative analyses of our microplastics sampling from surface water and water column. Briefly, this approach serves to calculate the number of particles to analyse and estimate the proportion of particles in a sample that possess a characteristic (*e.g.* shape), allowing a 15% error. In our configuration, in which the aim was to randomly sub-sample a specific number of particles (n), the total number of particles (N) was known. To this end, the following equation was used:

$$n = \frac{\frac{1}{4} + \frac{\varepsilon^2}{\left(u_{1-\frac{\alpha}{2}}\right)^2}}{\frac{\varepsilon^2}{\left(u_{1-\frac{\alpha}{2}}\right)^2} + \frac{1}{4N}}$$

where $u_{1-\frac{\alpha}{2}}$ is the fractal of order α of the standardized normal law. It is common to use a 95% degree of confidence (*i.e.* α = 0.05; $u_{1-\frac{\alpha}{2}}$ = 1.96) (Kedzierski *et al.*, 2019).

We further analysed the variation of synthetic polymer abundance across sample type (*i.e.* surface water, water column or pearl oyster) using Pearson's Chi-squared test for each study site independently. We then focused on polymers with similar contribution patterns among sample origin types and across study sites. Thus, Ahe, Manihi and Takaroa values associated with the targeted polymers were pooled to form triplicates and compare polymer abundance among sample types. All data were expressed as percentages (mean ± standard deviation, SD) and arcsine square root transformed before statistical analysis. Normality and homoscedasticity were tested with Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. Data complying with the conditions of normal distribution and homogeneity of variance were analysed using a one-way ANOVA. A Tukey's post-hoc test was used to determine the significant differences between the averages of each group. In all cases, $p < 0.05$ was defined as the threshold of statistically significant differences. All analyses were performed with RStudio v3.5 statistics software. Maps were produced based on mapping data from Andréfouët *et al.* (2006) and using QGIS software (v2.18.24).

Results

Background contamination

Microplastics were found in almost all control samples, with a median value of 7.2 (min = 0, max = 56.3; n = 9) and 8.8 (min = 0, max = 23.3; n = 15) MP/filter from *in situ* and lab samples, respectively. The dominant shape in both *in situ* and lab controls was "fragment", with a median value of 4 (min = 0, max = 12; n = 9) and 5 (min = 0, max = 11; n = 15) item/filter, respectively, followed by "fibre" reaching a median value of 0 (min = 0, max = 2; n = 9) and 1 (min = 0, max = 5; n = 15) item/filter, respectively. Detailed results on the background contamination from *in situ* and lab controls are presented in **Tables S2** and **S3**, respectively. Nevertheless, background contamination was considered negligible since the number of MP in procedural blanks was < 5% of the total abundance of MP detected in corresponding samples (Pivokonsky *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020) except for one sample from the lab, which reached 5.4% and corresponded to the digestion step with two pearl oysters from Takaroa. These two samples were removed prior to the analysis of MP concentration.

Particle characterization in marine compartments

Surface water

A total of 16,578 particles was quantified from the 33-manta trawl transects performed in the lagoons of Ahe, Manihi and Takaroa, representing a total volume of 5,021 m^3 filtered seawater. Proportions of fragments and fibres ranged from 83-86% and 14-17%, respectively, according to study site. The particle size class distribution was as follows: 0.020-0.200 mm (70.3 ± 14.5%), 0.200-0.335 mm (12.4 ± 5.3%), 0.335-1 mm (14.4 ± 9.0%), 1-5 mm (2.4 ± 1.1%), and > 5 mm (0.2 ± 0.4%) (**Figure 2**A). The relative abundance of the 0.020-0.200 mm size class was significantly greater than the others (ANOVA, $p < 0.001$). Based on the statistical sub-sampling procedure (Kedzierski *et al.*, 2019), 1,571 particles were randomly selected and characterized by FTIR spectroscopy. Synthetic matter was detected in all samples, composing 65%, 53% and 45% of identified particles (fragments and fibres) in Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (**Figure 2**B). Natural matter (*e.g.* cellulose, cotton or protein) was also detected in every sample, composing 25%, 37% and 40% of identified particles in Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (**Figure 2**B). The remaining portion was assigned to non-identifiable particles representing 10-15% of particles among study sites. Corresponding raw data of identified particles and their relative abundance in surface water samples are given in **Table S4**. Totals of 308, 245 and 270 microplastic particles were identified for Ahe, Manihi and Takaroa, respectively. The three most abundant synthetic polymers among MP according to study sites were as follows: Ahe:

polyethylene (PE) = 38.6% (n = 119), polyurethane (PU) = 15.6% (n = 48), polystyrene (PS) = 12.3% (n = 38); Manihi: PE = 38.0% (n = 93), polypropylene (PP) = 13.5% (n = 33), polyester = 13.5% (n = 33); and Takaroa: polyester = 34.1% (n = 92), PE = 33.7% (n = 91), polyamide (PA) = 8.5% (n = 23). The relative abundance of synthetic polymers identified in surface water samples according to study sites are detailed in **Table S5**.

Microplastics from surface water were significantly dominated by particles of a black/grey colour (39.8 ± 14.4%; ANOVA, $p = 0.002$) followed by blue (15.0 ± 2.8%) and red (12.6 ± 10.4%) MP (**Figure 3**A). Black/grey MP were most frequently PE (44.3 ± 2.8%), PP (14.4 ± 7.7%) (**Figure 4**A-B), PS (8.1 ± 1.2%) and PE-PP (7.5 ± 1.3%). Blue MP were represented by PE (41.7 ± 10.4%), polyester (19.5 ± 2.3%) and acrylic (14.8 ± 9.7%) and red MP were predominantly polyester (45.2 ± 29.8%) and PE (17.2 ± 23.9%). Raw data on MP colour distribution and corresponding polymer types predominance are detailed in **Table S6**.

To test the potential implication of pearl farming in the generation of black/grey PE and PP MP mostly found (**Figure 4**C-D), samples of visually black/grey ropes (**Figure 4**E) and spat collectors (**Figure 4**E) were collected in the field and examined by FTIR. The FTIR results identified PE, PP, and copolymer PE-PP for both these types of pearl-farming gear (**Figure 4**A-B).

Water column

A total of 18,427 particles was counted from the 27 vertical samplings with the planktonic net performed in the lagoons of Ahe (depth of 14-54 m), Manihi (depth of 27-46 m) and Takaroa (depth of 8-54 m), representing volumes of filtered seawater ranging from 0.8 to 5.1 m^3. Proportions of fragments and fibres ranged from 88-92% and 8-12%, respectively, according to study site. The particle size class distribution was as follows: particles 0.020-0.200 mm (93.2 ± 1.8%), 0.200-0.335 mm (4.4 ± 1.4%), 0.335-1 mm (2.1 ± 0.7%), 1-5 mm (0.3 ± 0.16%) and no particles were found in the > 5 mm size class (**Figure 2**C). The relative abundance of the 0.020-0.200 mm size class was significantly greater than the others (ANOVA, $p < 0.001$). A total of 991 particles was randomly selected among study sites and characterized. FTIR identification revealed the presence of synthetic matter in 50%, 43% and 27% of particles in Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (**Figure 2**D). Natural matter was marked by the presence of mineral compounds, especially in Takaroa atoll where it represented 16% of particles (**Table S2**). Relative abundance associated with natural matter reached 34%, 39% and 55% of particles in samples from Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (**Figure 2**D). Non-identifiable particles accounted for 16-17% according to study site. Corresponding raw data of identified particles and their relative abundance in water column samples are given in **Table S7**. Totals of 157, 108 and 103 microplastic particles were identified for Ahe, Manihi and Takaroa, respectively. The three

most abundant synthetic polymers among MP according to study sites were as follows: Ahe: PE = 31.8% (n = 50), polyisoprene = 16.6% (n = 26), PS = 12.1% (n = 19); Manihi: PE = 31.5% (n = 34), polyisoprene = 16.7% (n = 18), polyvinyl chloride (PVC) = 15.7% (n = 17); and Takaroa: PE = 24.3% (n = 25), polyester = 17.5% (n = 18), polyisoprene = 14.6% (n = 15). The relative abundance of synthetic polymers identified in water column samples at the study sites is detailed in **Table S8**.

Microplastics from the water column were significantly dominated by particles of a black/grey colour (45.4 ± 4.7%; ANOVA, $p < 0.001$) followed by orange (14.4 ± 1.4%) and yellow (12.6 ± 7.6%) MP (**Figure 3**B). Black/grey MP were most frequently PE (39.5 ± 10.6%), PE-PP (15.1 ± 11.0%) and PP (11.7 ± 7.0%) (**Figure 4**A-B). Orange MP were dominated by polyisoprene (81.7 ± 6.4%) and yellow MP included PS (19.6 ± 29.3%), PVC (24.1 ± 41.7%, mostly from Manihi) and polyisoprene (24.1 ± 23.1%). Raw data on MP colour distribution and the corresponding predominance of the different polymer types are detailed in **Table S6**.

Pearl oyster

A total of 11,083 particles was found in the digesta of 42 pearl oysters from the lagoons of Ahe, Manihi and Takaroa. Proportions of fragments and fibres ranged from 73-95% and 5-27%, respectively, according to study site. The particle size class distribution was as follows: particles 0.020-0.200 mm (95.0 ± 2.3%), 0.200-0.335 mm (4.1 ± 1.9%), 0.335-1 mm (0.9 ± 0.9%), and no particles were found in the 1-5 mm or > 5 mm size classes (**Figure 2**E). The relative abundance of the 0.020-0.200 mm size class was significantly greater than the others (ANOVA, $p < 0.001$). A total of 1,908 particles from pearl oyster samples were identified by FTIR spectroscopy. Composition of particles was dominated by natural matter representing 59%, 60% and 57% of particles, whereas synthetic matter represented 17%, 31% and 17% of particles in samples from Ahe, Manihi and Takaroa, respectively (**Figure 2**F). Natural matter was marked by the presence of residual organic matter such as pigments (3-11%) and proteins (3-7%). Non-identifiable particles ranged from 8 to 26% according to study site (**Figure 2**F). Raw data associated with composition and abundance of particles identified in pearl oyster samples are detailed in **Table S9**. Totals of 90, 178 and 104 microplastic particles were identified for Ahe, Manihi and Takaroa, respectively. The three most abundant synthetic polymers among MP according to study sites were as follows: Ahe: polyester = 18.9% (n = 17), PP = 14.4% (n = 13), PS = 12.2% (n = 11); Manihi: PE = 21.3% (n = 38), PP = 19.7% (n = 35), ethylene-vinyl acetate (EVA) = 15.2% (n = 27); and Takaroa: PP = 20.2% (n = 21), EVA = 19.2% (n = 20), PE = 14.4% (n = 15). The relative abundance of synthetic polymers identified in pearl oyster samples according to study sites are detailed in **Table S10**.

Microplastics in the pearl oyster samples were significantly dominated by black/grey colours (60.7 ± 9.3%; ANOVA, $p < 0.001$) followed by brown (12.2 ± 12.3%) and blue (8.8 ± 2.8%) MP (**Figure 3**C). Black/grey MP were mostly PP (25.0 ± 8.0%), EVA (20.1 ± 9.1%), PE (13.4 ± 0.6%) and PE-PP (9.8 ± 3.8%). Brown MP included particles of PVC (25.0 ± 25.0%, mostly from Manihi), PE (30.9 ± 27.0%), PE-PP (13.3 ± 21.0%) and blue MP were dominated by polyester (32.2 ± 11.3%), PS (17.0 ± 20.6%) and EVA (14.4 ± 6.8%). Raw data of MP colour distribution and corresponding polymer type predominance are detailed in **Table S6**.

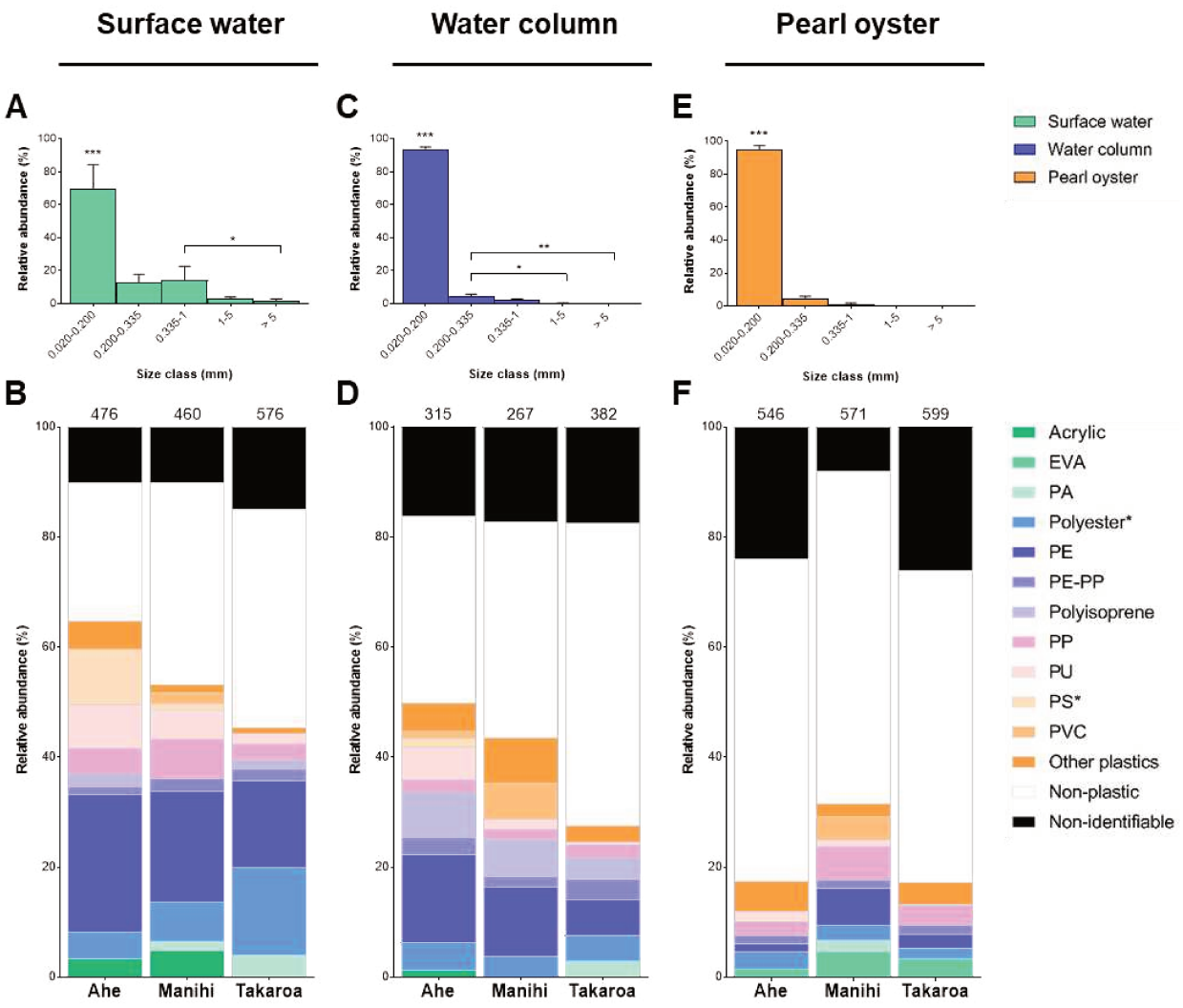


Figure 2. Particle size class distribution (all sampling locations taken together) and particle identification by FTIR spectroscopy among study sites in surface water (**A**, **B**), water column (**C**, **D**) and pearl oyster (**E**, **F**). Particle size class distribution according to sample type (**A**, **C** and **E**) in samples from Ahe, Manihi and Takaroa (mean ± SD). Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between particle size classes (Tukey's post-hoc test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Results of the FTIR analysis (**B**, **D** and **F**) illustrate the relative abundance of synthetic and natural ('non-plastic') matter as well as non-identifiable particles. Synthetic polymers commonly present in samples at > 1% are illustrated on the bar chart. Uncommon polymers and/or those < 1% are grouped under "other plastics". EVA: ethylene-vinyl acetate; PA: polyamide; Polyester (*including polyethylene terephthalate, PET); PE:

polyethylene; PP: polypropylene; PS: polystyrene (*mostly styrene copolymer based), PU: polyurethane, PVC: polyvinyl chloride. Numbers at the top of each column of the histogram indicate the corresponding number of identified particles (excluding the polymer rayon).

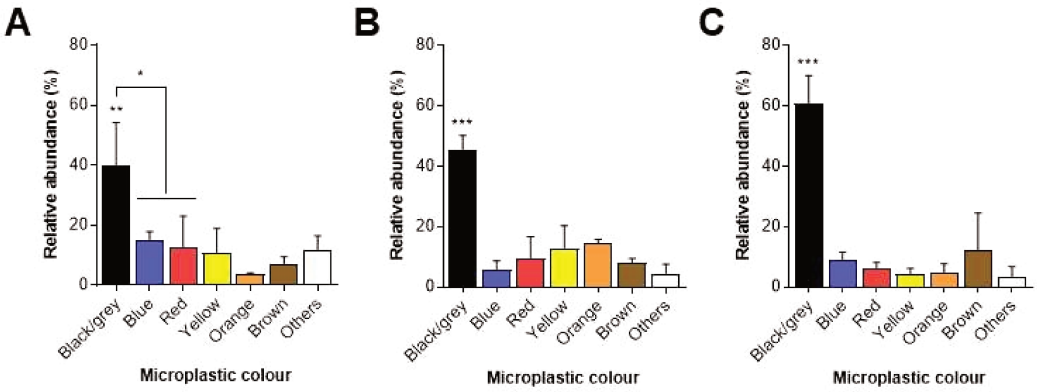


Figure 3. Microplastic colour distribution in surface water (**A**), water column (**B**) and pearl oyster (**C**) samples all sites taken together. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between microplastic colours (Tukey's post-hoc test: "*", $p < 0.05$; "**", $p < 0.01$; "***", $p < 0.001$).

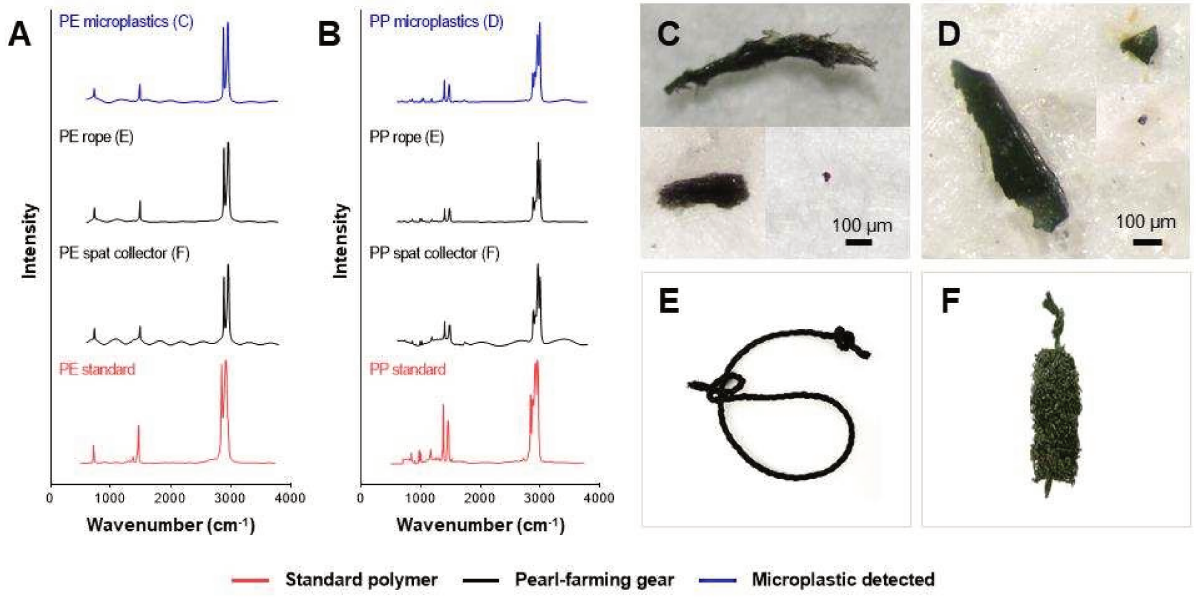


Figure 4. FTIR spectra of the black/grey microplastics mostly detected in both surface water and water column and the pearl-farming gear, visually black/grey, collected from pearl-farming lagoons. Spectral comparisons between PE (**A**) and PP (**B**) microplastic samples and their possible sources of origin associated with rope and spat collector, both identified as PE, PP or copolymer PE-PP. Illustrations of (**C**) PE microplastics, (**D**) PP microplastics, (**E**) rope and (**F**) spat collector.

Polymer dominance according to sample type

Our results show that the predominant types of polymer varied depending on sample type (Pearson's Chi-squared; $p < 0.001$; 2000 permutations) for each atoll independently (**Figure 5**; **Table S11**). Briefly, the cell with the greatest contribution to the total Chi-square score in both Ahe ($\chi^2 = 102.0$) and Manihi ($\chi^2 = 109.4$) was polyisoprene, mostly associated with the water column (relative contribution 12.4% and 17.6%, respectively). Positive association patterns between polyisoprene and the water column were also observed across atolls (+2.9 to +4.4; **Figure 5**) with relative abundance (15.9 ± 1.2%) significantly greater (ANOVA, $p < 0.001$) than in surface water (2.7 ± 1.3%; Tukey's test, $p < 0.001$) or pearl oyster (1.3 ± 1.4%; Tukey's test, $p < 0.001$) (**Figure 6**A). In Takaroa, the cell with the greatest contribution to the total Chi-square score ($\chi^2 = 102.0$) was EVA, mostly associated with pearl oyster samples (relative contribution 20.1%). Positive association patterns between EVA and pearl oyster were also observed across atolls (+3.4 to +4.2; **Figure 5**), with a relative abundance (14.4 ± 5.2%) significantly greater (ANOVA, $p = 0.002$) than in surface water (0.5 ± 0.9%; Tukey's test, $p = 0.005$) or water column (1.0 ± 1.0%; Tukey's test, $p = 0.005$) samples **(Figure 6**B). PE and PP also showed enrichment patterns that were relatively constant across atolls, mostly associated with surface water (+1.4 to +2.4) and pearl oyster (+2.0 to +2.4), respectively (**Figure 5**). PE abundance from all study sites was significantly less important in pearl oyster (14.9 ± 6.2%; ANOVA, $p = 0.003$) than in surface water (36.8 ± 2.7%; Tukey's test, $p = 0.003$) or water column (29.2 ± 4.3%; Tukey's test, $p = 0.02$; **Figure 6**C). In contrast, the relative abundance of PP was significantly greater in pearl oyster (18.1 ± 3.2%; ANOVA, $p = 0.008$) than surface water (9.1 ± 3.8%; Tukey's test, $p = 0.03$) and water column (5.9 ± 2.4 %; Tukey's test, $p = 0.01$; **Figure 6**D). Raw data of the relative contribution of each cell to the total Chi-square score across study sites are given in **Table S11** as are association values between polymer and sample type in **Table S12**.

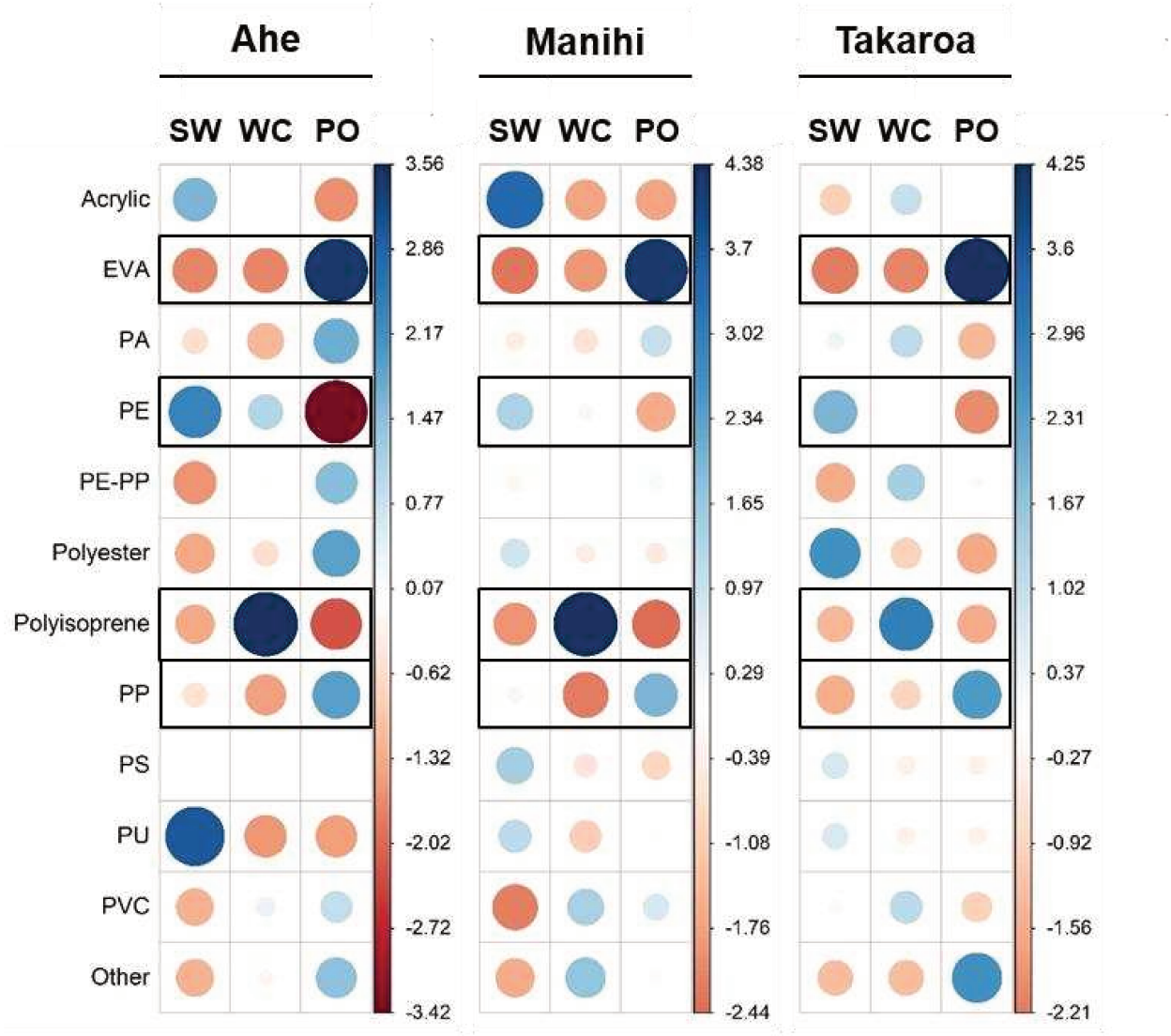


Figure 5. Positive and negative associations between polymers and sample types. Positive and negative Pearson residuals are shown in blue and red, respectively. Positive values in cells imply an attraction (positive association) between the corresponding polymer and sample type. Negative values imply a repulsion (negative association) between the corresponding polymer and sample type. Black frames indicate a similar association pattern between polymers and samples among study sites. SW: surface water; WC: water column; PO: pearl oyster.

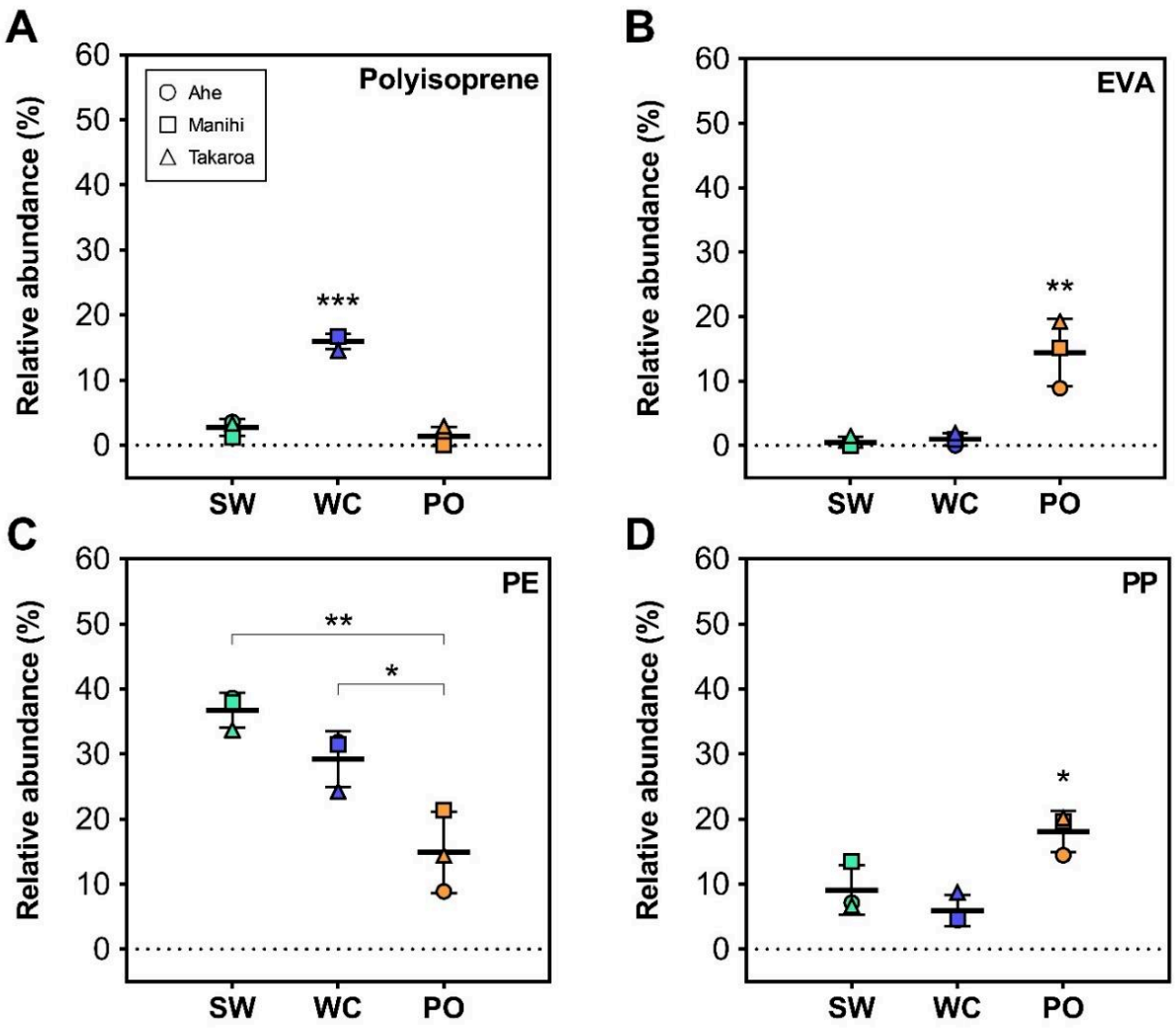


Figure 6. Polymer abundance according to sample type. (**A**) polyisoprene, (**B**) ethylene-vinyl acetate (EVA), (**C**) polyethylene (PE) and (**D**) polypropylene (PP). Mean (n = 3; from Ahe, Manihi and Takaroa data) ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between sample type (Tukey's post-hoc test: "*", $p < 0.05$; "**", $p < 0.01$; "***", $p < 0.001$).

Microplastics concentration and distribution

In Ahe atoll lagoon, mean MP concentrations of 3.0 ± 2.6 MP m^{-3} (n = 308 MP), 82.6 ± 67.6 MP m^{-3} (n = 157 MP) and 7.5 ± 10.1 MP g^{-1} dw (n = 90 MP) were measured in surface water, water column and pearl oyster, respectively (**Figure 7**A). Spatial distribution and concentrations of MP in surface water (0.5 to 8.3 item m^{-3}), water column (22.1 to 217.2 item m^{-3}) and pearl oysters (2.6 to 41.9 item g^{-1} dw) from Ahe are illustrated in **Figure 7**A and detailed in **Table S13**. Microplastics concentrations were relatively homogeneous in surface water whatever the sampling stations with a slight tendency to be higher in the centre part of the lagoon adjacent to

the pass, where concentrations were three times higher in inflow than in outflow sea currents. Otherwise, a particular pattern was observed considering MP distribution in the water column, showing higher concentrations in the south of the atoll, at stations 1, 2 and 4 (**Figure 7**A).

In Manihi atoll lagoon, mean MP concentrations of 3.3 ± 2.3 MP m^{-3} (n = 245 MP), 83.6 ± 35.1 MP m^{-3} (n = 108 MP) and 43.0 ± 35.3 MP g^{-1} dw (n = 178 MP) were measured in surface water, water column and pearl oyster, respectively (**Figure 7**B). Spatial distribution and concentrations of MP in surface water (1.0 to 8.4 item m^{-3}), water column (27.8 to 130.2 item m^{-3}) and pearl oyster (5.7 to 125.0 item g^{-1} dw) from Manihi are illustrated in **Figure 7**B and detailed in **Table S13**. Similar patterns of MP distribution were observed in both surface water and water column, with higher concentrations recorded in the centre and northern parts of the atoll lagoon (stations 4, 5, 6, 7, 8 and 9), while no difference was observed in the pass regardless of the direction of the current (**Figure 7**B).

In Takaroa atoll lagoon, mean MP concentrations of 0.9 ± 0.9 MP m^{-3} (n = 270 MP), 134.7 ± 224.0 MP m^{-3} (n = 103 MP) and 19.1 ± 16.1 MP g^{-1} dw (n = 104 MP) were measured in surface water, water column and pearl oyster, respectively (**Figure 7**C). Spatial distribution and concentrations of MP in surface water (0.2 to 3.2 item m^{-3}), water column (22.7 to 716.2 item m^{-3}) and pearl oyster (2.1 to 54.2 item g^{-1} dw) from Takaroa are shown in **Figure 7**C and detailed in **Table S13**. Microplastics concentrations were relatively homogeneous in surface water for all the sampling stations except station 3, directly opposite the pass, where the highest concentration was measured although no difference was observed in the pass regardless of the current direction. Otherwise, a particular pattern of MP distribution in water column was observed, with higher concentrations in the southern part of the atoll lagoon (station 1, 2 and 3; **Figure 7**C).

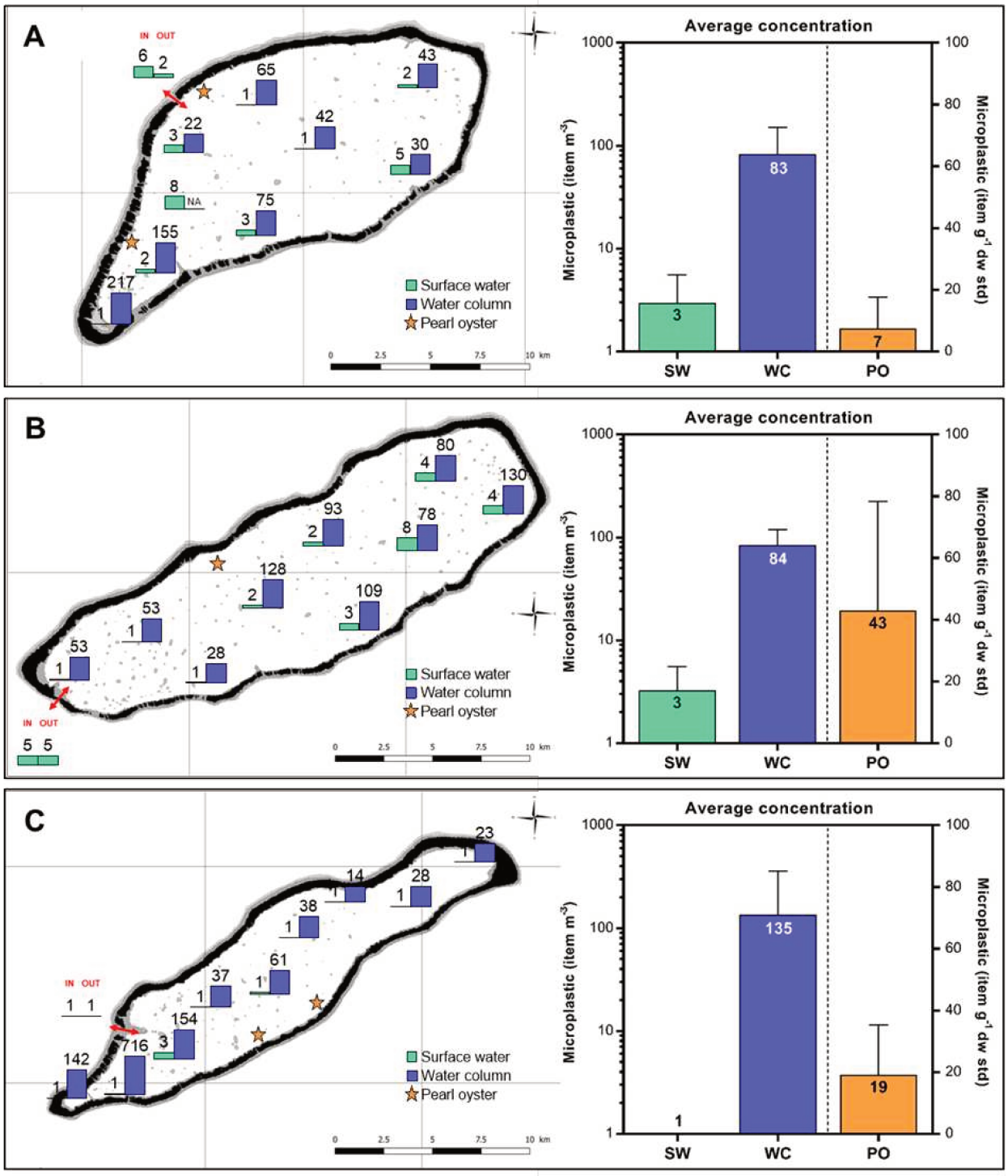


Figure 7. Spatial distribution and concentration (item m^{-3} or item g^{-1} dry weight for pearl oysters) of microplastics in Ahe (**A**), Manihi (**B**) and Takaroa (**C**).

Discussion

Widespread contamination of pearl-farming lagoons by microplastics

Microplastics were detected in all compartments tested: surface water, water column and cultivated pearl oysters. Focusing on surface water contamination, monitored according to a method commonly used and recommended worldwide (*i.e.* a manta trawl with a 335 µm mesh; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012), the mean MP concentration found in Polynesian pearl-farming atolls (2.4 ± 2.3 MP m^{-3}) was higher than those found in other coastal ecosystems such as the Bay of Brest in France (0.2 ± 0.3 MP m^{-3}) (Frère *et al.*, 2017), Bohai Sea in China (0.3 ± 0.3 MP m^{-3}) (Zhang *et al.*, 2017) or the semi-enclosed north-western Mediterranean Sea (ranging from 0.1 MP m^{-3} to 0.3 MP m^{-3}) (de Lucia *et al.*, 2014), even though these other areas are under greater demographic pressure than the atolls in our study (which have 491 to 674 inhabitants). The MP concentrations recorded in Ahe and Manihi are similar to recordings from sites already analysed on the Hong Kong coast in China (4.0 ± 1.2 MP m^{-3}) (Cheung *et al.*, 2018) and East Asian Seas (3.7 ± 10.4 MP m^{-3}) (Isobe *et al.*, 2015). Furthermore, an underestimation of surface water MP concentration was suspected at Takaroa due to a strong north-easterly wind regime (~ 10 knots) throughout the sampling period, which likely disturbed the vertical repartition of MP in the upper layers of the water column (Collignon *et al.*, 2012). As a global trend, Poulain *et al.* (2019) estimated that corrected microplastics concentrations were 2.4 to 5,006 times more abundant than uncorrected ones, the highest difference being obtained for large MP (1-5 mm) using the ellipsoid model. The concentrations of MP floating at the sea surface in Takaroa lagoon were therefore corrected using the modelling approach introduced by Kukulka et al (2012) (**Table S13**). The obtained corrected concentrations calculated were indeed higher than uncorrected ones reaching an order of magnitude of 10^3 to 10^4 which appeared surprisingly high whereas the wind reached 5.5 m s^{-1} during the sampling campaign, meaning 0.5 m s^{-1} above the limit considered negligible. They must therefore be considered with caution to avoid overestimating the concentration of floating MP. The high variability in MP levels observed at the sea surface of Takaroa may also be driven by the presence of accumulation areas created by waves, winds (Kim *et al.*, 2015; Kukulka *et al.*, 2016; Liubartseva *et al.*, 2016) and hydrodynamic factors (Rocha-Santos and Duarte, 2015) that are mainly determined by the current flow through the pass in such lagoons. For instance, the highest concentrations of floating MP recorded in Ahe and Takaroa were in the southern areas that are considered as accumulation areas (*i.e.* showing many suspended particles and high turbidity), less subject to water renewal from the current flow of the pass and strengthened by the influence of the dominant wind (NE, ENE). The occurrence of such MP accumulation zones protected from pass inflow and outflow is also supported by a hydrodynamic model made in Ahe and coincides with pearl oyster larval trajectories (Thomas *et*

al., 2016). An opposite pattern was observed in Manihi since the pass is located in the south of the atoll leading to an accumulation area in the northern part, which is less subjected to water renewal. Although Manihi is the largest studied atoll (165 km^2) with the lowest number of authorized concessions (*i.e.* n = 498), it displayed the highest concentration of floating MP and pearl oyster contamination levels. This result could, therefore, be linked to lower water renewal, which reaches 130 days of residence time, in contrast to 34 and 76 days of residence time in Ahe and Takaroa, respectively (Pagès *et al.*, 2001). Overall, these results suggest that these remote insular territories are subjected to significant MP contamination pollution and that water currents going in and out through the passes may strongly influence floating debris concentration and distribution in the lagoons.

The water column is a highly contaminated compartment in French Polynesia lagoons

Monitoring MP in the water column in addition to surface water enabled us to draw a more complete picture of lagoon contamination and to accurately estimate the exposition levels of cultivated pearl oysters reared in the water column (4-6 m depth). Our results showed MP abundance in the water column (8-54 m depth) almost two orders of magnitude higher (range 6-594) than that in surface water. Considering an extrapolation method, Song *et al.* (2018) also demonstrated that the number of MP in the water column in Korean coastal waters was 2 to 58 times higher than in surface water. Significant quantities of MP have been detected in water bodies of the Bohai Sea (5-30 m depth; Dai *et al.*, 2018), in Korean coastal waters (3-58 m depth; Song *et al.*, 2018) and in the Arctic Ocean (6 m depth; Lusher *et al.*, 2015), suggesting that levels in this compartment may be largely underestimated. The high proportion of MP sequestered in the water column is caused by vertical movement of which the rising and sinking velocities depend on polymer density, size and shape (Enders *et al.*, 2015; Ballent *et al.*, 2016). In our study, PE and polyisoprene were the predominant polymer types in the water column despite their low density (0.917-0.965 g cm^{-3}; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Previous studies have provided evidence of the influence of wind, surface heat fluxes and Langmuir turbulence on vertical mixing of buoyant MP and MP concentrations in surface water (Kukulka *et al.*, 2012, 2016). This could explain the abundance of buoyant MP in the water column and the divergence we observed between the two compartments, especially in Takaroa, where the difference was particularly marked. Furthermore, vertical movement may also occur due to biological processes such as biofouling (Fazey and Ryan, 2016), aggregation (Bergmann *et al.*, 2017) or ingestion-egestion by marine organisms (Cole *et al.*, 2016), which might have an effect on MP buoyancy, increasing their sinking rate (Kooi *et al.*, 2017). Both observational and modelling studies have also shown that small MP have shorter residence times in the surface layer and increased vertical distribution with decreasing size (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; Enders *et al.*, 2015). Considering

the relative abundance of the predominant size class 20-200 µm in both surface water (69.4 ± 14.9%) and water column (93.2 ± 1.8%), this provides a further explanation for the observed difference in MP abundance. However, we cannot rule out a bias due to the difference in sampling method, notably in net-mesh size between the compartments (40 µm vs 335 µm; Lindeque *et al.*, 2020). Field studies showed that small MP were present with increasing abundance as size decreased by a scaling factor ranging from 1.96 (Enders *et al.*, 2015) to 2.13 (Erni-Cassola *et al.*, 2017) for the size range 10-110 µm. Studies dealing with vertical profiles of MP distribution are very scarce and the lack of standardized protocols hampers thorough comparison of results from different compartments. For instance, none of the previous cited studies have employed the same sampling tools, mesh sizes, sampling depths or laboratory sample processing protocols, making quantitative comparison difficult (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Overall, these results remind us of the knowledge gap regarding the vertical behaviour of MP at sea, and of how environmental surveys of surface waters are far from sufficient for evaluating concentrations and ecological risks related to MP in the water body.

Dominance of small-sized, fragment-shaped and polyethylene microplastics in seawater

Size is an important feature influencing the potential ecological risks of MP particularly because of the size-based selectivity affecting ingestion (reviewed in Wright *et al.*, 2013), including potential trophic transfer (reviewed in Auta *et al.*, 2017) and toxicity (Jeong *et al.*, 2016). The main size class of MP observed in seawater was 20-200 µm both in surface water and the water column. This result indicates that smaller MP were caught than the net-mesh size, particularly in surface water (> 335 µm), probably due to homo- and/or heteroaggregation (Zhao *et al.*, 2017). In this study, fragments were identified as the dominant form of MP in seawater (ranging from 83% to 92%) throughout the three study sites. The dominance of fragments over fibres in seawater suggests that the source of MP in the pearl-farming lagoons is more related to the breakdown of larger plastic debris (Andrady, 2011) than to direct primary inputs such as domestic waste from nearby villages, including sewage contaminated by fibres from washing clothes (Browne *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2019). This pattern may result from Polynesian dressing habits, as tropical environment involves the use of less clothing that produces lots of fibres (*e.g.* synthetic knitwear or fleece; Napper and Thompson, 2016) as well as the relatively small human populations (491 to 674 inhabitants) residing on the studied atolls. Although it is clearly demonstrated that inputs from land are the main source of plastic pollution in the ocean (Jambeck *et al.*, 2015), human activity at sea is also considered as a source (Lebreton *et al.*, 2018). Fishing and aquaculture gear as well as marine vessels can lead to the increase of plastic waste, and therefore to MP in the oceans (Lebreton *et al.*, 2018; Carney Almroth and Eggert, 2019). One study revealed that mariculture-derived MP made up approximately 56% and 37% of the MP in

the seawater and sediment of Xiangshan Bay in China, respectively, due to an intense mariculture activity in a semi-enclosed narrow bay where few seawater exchanges occur with the open sea (Chen *et al.*, 2018). Indeed, atoll lagoons are also semi-enclosed environments. Thus, considering (i) the high MP contamination levels in the lagoons (ii) the low population density and (iii) the high proportion of secondary microplastics (plastic fragments) in all samples, it is likely that maritime activities, including pearl farming, and their associated waste (Andréfouët *et al.*, 2014) could be a source of this environmental pollution.

We identified 31 synthetic polymers, among which polyethylene (PE) was the dominant polymer type in surface water (34-39%) and the water column (24-32%), as found by most other studies (Frère *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020) as a consequence of its worldwide manufacture and use (PlasticsEurope, 2019). PE was followed by polyester, polyamide (PA), polypropylene (PP), polyurethane (PU), and polystyrene (PS) in surface water, while polyisoprene and polyester were prevalent in the water column. According to a source-specific classification system reported by Wang *et al.* (2019) and an assessment of MP derived from mariculture in Xiangshan Bay, China (Chen *et al.*, 2018), fishing ropes, lines and nets are most likely important sources of PE, PP, PE-PP and PA in the aquatic ecosystem. Here we suggested that synthetic ropes and spat collectors contribute significantly to the MP pollution. Indeed, synthetic ropes and spat collectors, the main plastic equipment used in pearl farming, are made of PE or PP, respectively (though sometimes both may be made in PE-PP) and are black-grey like the most sampled MP represented by black-grey PE, PP and PE-PP. Furthermore, concerning polyisoprene which is an infrequent polymer, sources of the orange and yellow fragments observed mostly in the water column remain to be elucidated. Overall, the assessment of MP pollution in atoll lagoons without any pearl-farming pressure would provide a relevant means of comparison to examine the influence of pearl-farming activity in MP contamination of lagoons.

Seawater contamination is reflected in cultivated pearl oysters

Size frequency distribution of all the particles analysed in pearl oyster samples corresponded to the particle size range retained by *P. margaritifera* when feeding (*i.e.* 2-200 µm; Pouvreau *et al.*, 1999); the 20-200 µm fraction accounted for 95% of all particles. Our lower size threshold of detection for particles was 20 µm (due to difficulties of visual observation and manual selection with ultra-thin pliers), so the quantity of particles < 20 µm may have been underestimated. However, upper size ranges of 200-335 µm (4%) and 335-1000 µm (1%) were present although unexpected. As pearl oysters were digested whole, it is not known which of their tissues these particles were associated with. Even if pearl oyster samples were rinsed before underwent the digestion process, it is possible that particles were trapped in the gills or on the outside of the

oyster rather than being present in the digestive tract. Indeed, adherence of MP to mussel soft tissue has been proposed as an additional uptake pathway for MP alongside ingestion (Kolandhasamy *et al.*, 2018).

In this study, we used FTIR techniques to determine particle composition of a randomly selected subset of all counted and measured particles. We identified MP in all pearl oysters collected in the study sites. This 100% presence is close to observations made in wild mussels, *Mytilus galloprovincialis*, *Choromytilus meridionalis* and *Aulacomya ater* (98%, n = 168) sampled in southern Africa (Sparks, 2020) or cultivated mussels, *Mytilus edulis* (90%, n = 120) sampled on French coasts (Phuong *et al.*, 2018). However, the mean MP concentrations ranging from 7.5 to 43.0 MP g^{-1} dry weight (dw) in cultivated pearl oysters are much higher (1.3 to 7.3 MP g^{-1} wet weight: ww; using a conversion factor from dw to ww of 6 assuming a lyophilization rate of 0.17) than those reported in *C. gigas* and *M. edulis* reared in the North Sea (0.47 ± 0.16 and 0.36 ± 0.07 MP g^{-1} ww, respectively; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014) and in the range of those found in *M. edulis* from Chinese coastal waters (1.5 to 5.4 MP g^{-1} ww; Qu *et al.*, 2018). Interestingly, as it was the case for the water body contamination, the majority of MP found in pearl oysters consisted of fragments, reaching 73-95% of all particles. Several studies demonstrated a higher MP contamination in cultivated mussels than wild ones (Mathalon and Hill, 2014; Phuong *et al.*, 2018). Phuong *et al.* (2018) suggested that this could be related to the proximity of cultivated mussels to MP coming from degradation of the plastic materials (PE, PP, polyester) of the collectors, ropes and nets used in bivalve aquaculture from the spat-collection stage onwards (Phuong *et al.*, 2018). In our study, we did not evaluate MP contamination in wild pearl oysters to corroborate this hypothesis since wild individuals are protected by a local law. However, as observed in seawater, PE, PP, PE-PP and polyester were the predominant polymers in pearl oysters, in addition to ethylene-vinyl acetate (EVA). Our results also demonstrated a significant higher PP abundance in pearl oyster than in seawater samples, suggesting a preferential ingestion and/or retention of these MP in oyster tissues. This phenomenon is also particularly true for uncommon polymers such as EVA, a polymer used in antifouling paints for ships (Doganci *et al.*, 2012), which had a significantly higher relative abundance in pearl oyster (from 8.9% to 19.2%) than in seawater (< 1%). The occurrence of EVA could be attributed to boat traffic (Peng *et al.*, 2020), which is the primary mode of transport for local populations and essential for pearl farming and fishing activities. A relationship between contamination levels in the water column and in pearl oysters was also seen with polyvinyl chloride (PVC). Indeed, the abundance of PVC was relatively low in the water column (1.9-2.5%) and pearl oysters (0.0-3.3%) from Ahe and Takaroa, while in Manihi it accounted for 15.7% and 13.5% of polymer types in water column and pearl oyster samples, respectively. This result is comparable to the positive relationship between MP type and associated levels in mussels and water already demonstrated in the coastal waters of China (Qu *et al.*, 2018). Our study further

confirms that MP contamination was widespread in pearl oysters and that *P. margaritifera* could be used as an indicator of MP pollution in French Polynesian lagoons. Nevertheless, more large-scale investigations should be conducted to find a quantitative relationship between MP abundance in pearl oysters and their living environments, and to further study the fate of MP once ingested by pearl oysters. This would involve, as a first step, the development of standardized methods for sampling, isolation, quantification, identification and monitoring in pearl oysters (Hermsen *et al.*, 2018).

Conclusion

Our findings demonstrate the widespread MP contamination of pearl-farming atoll lagoons, with the dominance of small-sized fragments (20-200 µm) in the water column as well as in pearl oysters. This raises the question of the potential threat posed by microplastics to cultivated pearl oysters and the overall balance of the lagoon ecosystem. Further work is needed to understand this emerging risk and to predict potential impacts on pearl oyster and pearl-farming sustainability. These *in situ* data will make it possible to test relevant environmental scenarios as accurately as possible (*i.e.* real concentrations and specific MP types) on *P. margaritifera* in laboratory conditions to obtain more pertinent answers to local policies. Finally, data collection in a large variety of atoll lagoons including atolls with no pearl-farming activity and environmental aging processes of pearl farming gears are needed in order to elucidate sources and establish the implication of pearl farming in the observed MP contamination.

Supplementary information

The supplementary information contains a summary table of study sites characteristics and main results of the present study (**Table S1**); results of quality controls performed *in situ* (**Table S2**) and in the laboratory (**Table S3**); particles identified by spectroscopy in surface water samples (manta trawl sampling) according to study site and their relative abundance (**Table S4**); the relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in surface water samples (**Table S5**); microplastic colours distribution and predominant polymer types among sample types (**Table S6**); particles identified by spectroscopy in water column samples (planktonic net) according to study site and their relative abundance (**Table S7**); the relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in water column samples (**Table S8**); particles identified by spectroscopy in pearl oyster samples after digestion according to study site and their relative abundance (**Table S9**); the relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in pearl oyster samples (**Table S10**); the relative contribution of polymer and sample type to the total Chi-square score (**Table S11**); positive and negative

associations between polymer and sample type (**Table S12**) and raw data of microplastic concentrations in surface water, water column and cultivated pearl oysters from Ahe, Manihi and Takaroa (**Table S13**).

Table S1. Summary table of study sites characteristics and main results of the present study.

	Study site		
	Ahe	**Manihi**	**Takaroa**
Atoll characteristics			
Sampling time	March 2018	March 2018	November 2017
Lagoon surface (km^2)	145	165	89
Water residence time (days)	34	130	76
Pearl-farming marine concessions (ha)	831 (5,6%)	413 (2,5%)	392 (4,4%)
Collecting stations (nb)	1,536	498	887
Wind conditions during sampling ($km\ h^{-1}$)	10-15	10-15	15-20
Microplastic characteristics			
Dominant shape			
Surface water	Fragment	Fragment	Fragment
Water column	Fragment	Fragment	Fragment
Pearl oyster	Fragment	Fragment	Fragment
Dominant colour			
Surface water	Black/grey	Black/grey	Black/grey
Water column	Black/grey	Black/grey	Black/grey
Pearl oyster	Black/grey	Black/grey	Black/grey
Dominant polymers			
Surface water	Polyethylene (39%) Polyurethane (16%) Polystyrene (12%)	Polyethylene (38%) Polypropylene (14%) Polyester (14%)	Polyethylene (34%) Polyester (34%) Polyamide (9%)
Water column	Polyethylene (32%) Polyisoprene (17%) Polystyrene (12%)	Polyethylene (32%) Polyisoprene (17%) Polyvinyl chloride (16%)	Polyethylene (24%) Polyester (18%) Polyisoprene (15%)
Pearl oyster	Polyester (19%) Polypropylene (14%) Polystyrene (12%)	Polyethylene (21%) Polypropylene (20%) Ethylene-vinyl acetate (15%)	Polypropylene (20%) Ethylene-vinyl acetate (19%) Polyethylene (14%)
Dominant size class (µm)			
Surface water	20-200	20-200	20-200
Water column	20-200	20-200	20-200
Pearl oyster	20-200	20-200	20-200
Microplastic concentration			
Surface water (MP m^{-3})	3.0 ± 2.6	3.3 ± 2.3	0.9 ± 0.9
Water column (MP m^{-3})	82.6 ± 67.6	83.6 ± 35.1	134.7 ± 224.0
Pearl oyster (MP g^{-1} dry weight)	7.5 ± 10.1	43.0 ± 35.3	19.1 ± 16.1

Table S2. Results of quality controls performed *in situ*.

Study site	Sampling station	Fragment (item)	Fibre (item)	Total (item)	Total identified by spectroscopy (item)	Synthetic fragment (item)	Synthetic fibre (item)	Synthetic fragment (%)	Synthetic fibre (%)	Synthetic particle from total identified (%)	Total synthetic particle in control sample (item)	Synthetic particle in corresponding *in situ* samples (item)	Ratio (%)
Ahe	1-2-3	54	0	54	43	**6** PE (black, n=1; orange, n=1); Polyacrylate styrene (black, n=1); PP (grey, n=2); PU (brown, n=1)	**0**	100.0	0.0	14.0	7.5	1929.7	**0.4**
Ahe	4-5-6	159	10	169	36	**12** PE (grey, n=2); Polyacrylate styrene (brown, n=1); PP (pink, n=4; brown, n=1); PU (orange, n=1); Polyester (red, n=2; blue, n=1)	**0**	100.0	0.0	33.3	56.3	1504.6	**3.7**
Ahe	7-8-9	65	5	70	39	**4** PE (grey, n=3; blue, n=1)	**0**	100.0	0.0	10.3	7.2	1573.0	**0.5**
Manihi	1-2-3	111	11	122	43	**6** PE (blue-green; n=1); PA (grey; n=4); Polyisoprene (grey; n=1)	**0**	100.0	0.0	14.0	17.0	900.8	**1.9**
Manihi	4-5-6	77	5	82	43	**2** PE (grey, black; n=2)	**1** PET (blue, n=1)	66.7	33.3	7.0	5.7	2093.9	**0.3**
Manihi	7-8-9	43	11	54	36	**6** PA (white, n=1; yellow, n=1); Polyester (brown, n=1; black, n=1); PP (transparent, n=1; red, n=1)	**2** Polyester (red, n=1; blue, n=1)	75.0	25.0	22.2	12.0	3005.7	**0.4**
Takaroa	1-2-3	0	0	0	0	**0**	**0**	0.0	0.0	0.0	0.0	1967.5	**0.0**
Takaroa	4-5-6	27	5	32	32	**0**	**1** Polyester (red, n=1)	0.0	100.0	3.1	0.1	819.2	**0.0**
Takaroa	7-8-9	2	1	3	0	**0**	**0**	0.0	0.0	0.0	0.0	394.4	**0.0**

Table S3. Results of blank quality controls performed in the lab.

Blank	Corresponding *in situ* samples	Fragment (item)	Fibre (item)	Total (item)	Total identified by spectroscopy (item)	Synthetic fragment (item)	Synthetic fibre (item)	Synthetic fragment (%)	Synthetic fibre (%)	Synthetic particle from total identified (%)	Total synthetic particle in control sample (item)	Synthetic particle in corresponding *in situ* samples (item)	Ratio (%)
1	Ahe/PO/1-2-3-4	29	21	50	43	**2** Olefin (grey, n=1); EVA (green, n=1)	**1** PVCA (red, n=1)	66.7	33.3	7.0	3.5	650.0	**0.5**
2	Ahe/PO/5-6-7-8	17	14	31	31	**3** EVA (beige, n=1); PE (blue, n=1; green, n=1)	**1** Polyester (transparent, n=1)	75.0	25.0	12.9	4.0	606.0	**0.7**
3	Ahe/PO/9-10-11-12-13-14	11	7	18	15	**6** PP (black; n=2); PE (grey; n=3); PE-PP (grey; n=1)	**0**	100.0	0.0	40.0	7.2	635.0	**1.1**
4	Ahe/SW/1-2-3-4-5-6-7-8-9-pass and Manihi/SW/1	211	4	215	43	**0**	**0**	0.0	0.0	0.0	0.0	6979.0	**0.0**
5	Ahe/WC/5-6-7-8-9 and Manihi/WC/1	90	6	96	43	**7** PE (green, n=1); EVA (grey, n=1); PE (grey, n=1); PE (brown, n=1); Styrene polyacrylate (yellow, n=1); PS (black, n=1); POM (grey, n=1)	**3** Polyester (red, n=1); PE-PP (grey, n=1); PP (yellow, n=1)	70.0	30.0	23.3	22.3	4845.0	**0.5**
6	Ahe/WC/1-2-3-4 and Manihi/SW/pass	2	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
7	Manihi/SW/2-3-4-5-6-7	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
8	Manihi/SW/8-9	9	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
9	Manihi/WC/2-3-4-5-6-7	4	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**

10	Manihi/WC/8-9	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
11	Manihi/PO/1-2	65	5	70	36	**11** PMMA (yellow, n=1; red, n=1); PA (black, n=1; white, n=1); PE (black, n=1; beige, n=1); PET (black, n=2); PP (black, n=2); EVA (black, n=1)	1 PET (pink, n=1)	91.7	8.3	33.3	23.3	1115.0	**2.1**
12	Manihi/PO/3-4	64	5	69	39	**8** PA (white, n=1); PE (beige, n=2; black, n=1; white, n=1); Epoxy resin (purple, n=1); EVA (blue, n=1)	**1** Acrylic (red, n=1)	88.9	11.1	23.1	15.9	499.0	**3.2**
13	Manihi/PO/5-6-7-8	58	8	66	42	**3** PET (beige, n=1; orange, n=1); PU (black, n=1)	**0**	100.0	0.0	7.1	4.7	2634.0	**0.2**
14	Manihi/PO/9-10-11-12-13	42	5	47	40	**3** Polyester (beige, n=1); PE-PP (black, n=1); PET (black, n=1)	**5** PET (blue, n=2; black, n=1; red, n=1); Nitrile rubber containing PVC (green, n=1)	37.5	62.5	20.0	9.4	1790.0	**0.5**
15	Manihi/PO/14	39	5	44	30	**5** Polyacrylamide (beige, n=1; transparent, n=1); EVA (black, n=3)	**1** PET (blue, n=1)	83.3	16.7	20.0	8.8	263.0	**3.3**
16	Takaroa/SW/1-2-3	37	38	75	36	**4** PA (grey, n=1); PS (grey, n=1); EVA (pink,	**4** Polyester (orange, n=2; beige,	50.0	50.0	22.2	16.7	1440.0	**1.2**

						n=1); PEC (grey, n=1)	n=1); PE (grey, n=1)						
17	Takaroa/SW/4-5-6	12	4	16	16	**2** EVA (black, n=1); PE-PP (black, n=1)	**0**	100.0	0.0	12.5	2.0	1097.0	**0.2**
18	Takaroa/SW/7-8-9	2	3	5	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
19	Takaroa/SW/pass	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
20	Takaroa/WC/1-6	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
21	Takaroa/WC/2-3-4	6	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
22	Takaroa/WC/5-7-8-9	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
23	Takaroa/PO/1-2-3	3	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
24	Takaroa/PO/4-5-6-7	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**
25	Takaroa/PO/8-9	38	9	47	40	**8** PEC (black, n=1); EVA (black, n=3); Acrylic (black, n=1); PP (black, n=1); PE (black, n=2)	**2** Polyester (orange, n=1); EVA (red, n=1)	80.0	20.0	25.0	11.8	265.0	**4.4**
26	Takaroa/PO/10-11	19	3	22	22	**9** EVA (black, n=4); PE (yellow, n=1; brown, n=1); Polyisoprene (orange, n=2), PVC (brown, n=1)	**0**	100.0	0.0	40.9	9.0	166.0	**5.4**
27	Takaroa/PO/12-13-14	31	4	35	27	**6** PVC (grey, n=6)	**0**	100.0	0.0	22.2	7.8	321.0	**2.4**

Table S4. Particles identified by spectroscopy in surface water samples (manta trawl sampling) according to study site and their relative abundance. A total of 1,571 particles was analysed based on a sub-sampling procedure (Kedzierski *et al.*, 2019).

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	16	3.4	22	4.8	0	0.0
EVA	0	0.0	0	0.0	0	0.0
PA	0	0.0	8	1.7	23	4.0
Polyester	23	4.8	33	7.2	92	16.0
PE	119	25.0	93	20.2	91	15.8
PE-PP	7	1.5	10	2.2	12	2.1
Polyisoprene	11	2.3	0	0.0	9	1.6
PP	22	4.6	33	7.2	18	3.1
PU	48	10.1	6	1.3	0	0.0
PS	38	8.0	24	5.2	10	1.7
PVC	0	0.0	9	2.0	0	0.0
Other plastics	24	5.0	7	1.5	6	1.0
Coton	15	3.2	18	3.9	79	13.7
Lignin/Cellulose	25	5.3	39	8.5	28	4.9
Mineral compounds	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Pigment	16	3.4	44	9.6	16	2.8
Protein	9	1.9	11	2.4	30	5.2
Stearate	0	0.0	0	0.0	14	2.4
Other non-plastics	55	11.6	57	12.4	62	10.8
Non-identifiable	48	10.1	46	10.0	86	14.9
Total	**476**	**100.0**	**460**	**100.0**	**576**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S5. Relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in surface water samples.

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	16	5.2	22	9.0	0	0.0
EVA	0	0.0	0	0.0	4	1.5
PA	2	0.6	8	3.3	23	8.5
Polyester	23	7.5	33	13.5	92	34.1
PE	119	38.6	93	38.0	91	33.7
PE-PP	7	2.3	10	4.1	12	4.4
Polyisoprene	11	3.6	3	1.2	9	3.3
PP	22	7.1	33	13.5	18	6.7
PU	38	12.3	24	9.8	10	3.7
PS	48	15.6	6	2.4	1	0.4
PVC	1	0.3	9	3.7	2	0.7
Other plastics	21	6.8	4	1.6	8	3.0
Total	**308**	**100.0**	**245**	**100.0**	**270**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S6. Microplastic colours distribution and predominant polymer types among sample types.

	Microplastic colour						
	Black/grey	Blue	Red	Yellow	Orange	Brown	Others
Surface water							
Ahe	89	53	14	59	10	29	39
Manihi	138	35	21	14	9	13	15
Takaroa	72	28	54	13	9	11	34
Total	**299**	**116**	**89**	**86**	**28**	**53**	**88**
Predominant polymer types (%)	PE (44.5%); PP (15.7%); PE-PP (7.4%); PS (8.4%); Others (24.1%)	PE (44.0%); Polyester (19.0%); Acrylic (16.4%); Others (20.7%)	Polyester (56.2%); PE (28.0%); Others (15.7%)	PU (53.5%); PS (10.5%) ; Others (36.0%)	Polyisoprene (53.6%); PE (21.4%); Polyester (17.9%); Others (7.1%)	PS (52.8%); Polyester (11.3%); PA (9.4%); Others (26.4%)	-
Relative abundance (mean ± SD)	**39.8 ± 14.4**	**15.0 ± 2.8**	**12.6 ± 10.4**	**10.6 ± 8.3**	**3.7 ± 0.3**	**6.7 ± 2.7**	**11.6 ± 4.9**
Water column							
Ahe	66	14	7	30	24	11	12
Manihi	57	3	7	18	18	11	1
Takaroa	47	6	18	4	13	8	5
Total	**170**	**23**	**32**	**52**	**55**	**30**	**18**
Predominant polymer types (%)	PE (40.0%); PE-PP (14.1%); PP (11.2%); Others (34.7%)	Polyester (39.1%); PE (34.8%); Others (26.1%)	Polyester (68.7%); PE (25.0%); Others (6.2%)	PS (32.7%); PVC (25.0%); Polyisoprene (15.4%); Others (26.9%)	Polyisoprene (81.8%); Others (18.2%)	PE (50.0%); PE-PP (6.7%); PVC (13.3%); Others (30.0%)	-
Relative abundance (mean ± SD)	**45.4 ± 4.7**	**5.7 ± 3.0**	**9.4 ± 7.4**	**12.6 ± 7.6**	**14.4 ± 1.4**	**8.1 ± 1.4**	**4.4 ± 3.3**
Pearl oyster							
Ahe	63	10	6	4	4	8	0
Manihi	81	9	6	10	3	42	11
Takaroa	58	9	7	2	7	2	3
Total	**202**	**28**	**19**	**16**	**14**	**52**	**14**
Predominant polymer types (%)	PP (25.7%); EVA (19.8%); PE (13.4%); PE-PP (9.4%); Others (31.7%)	Polyester (35.7%); PS (17.9%); EVA (14.3%); Others (32.1%)	Polyester (42.1%); PE (15.8%); EVA (15.8%); Others (26.3%)	PA (50.0%); PE (18.7%); EVA (12.5%); Others (18.7%)	Polyester (57.1%); Polyisoprene (21.4%); Others (21.4%)	PVC (44.2%); PE (36.5%); PE-PP (7.7%); Others (11.5%)	-
Relative abundance (mean ± SD)	**60.7 ± 9.3**	**8.8 ± 2.8**	**6.0 ± 2.1**	**4.2 ± 1.9**	**4.7 ± 3.1**	**12.2 ± 12.3**	**3.4 ± 3.4**

Table S7. Particles identified by spectroscopy in water column samples (planktonic net) according to study site and their relative abundance. A total of 991 particles was analysed based on a sub-sampling procedure (Kedzierski *et al.*, 2019).

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	4	1.3	0	0.0	0	0.0
EVA	0	0.0	0	0.0	0	0.0
PA	0	0.0	0	0.0	11	2.9
Polyester	16	5.1	10	3.7	18	4.7
PE	50	15.9	34	12.7	25	6.5
PE-PP	10	3.2	5	1.9	14	3.7
Polyisoprene	26	8.3	18	6.7	15	3.9
PP	7	2.2	5	1.9	9	2.4
PU	5	1.6	0	0.0	0	0.0
PS	19	6.0	5	1.9	2	0.5
PVC	4	1.3	17	6.4	0	0.0
Other plastics	16	5.1	22	8.2	11	2.9
Coton	9	2.9	16	6.0	23	6.0
Lignin/Cellulose	27	8.6	0	0.0	9	2.4
Mineral compounds	6	1.9	21	7.9	60	15.7
Pigment	24	7.6	20	7.5	49	12.8
Protein	2	0.6	0	0.0	15	3.9
Stearate	6	1.9	19	7.1	3	0.8
Other non-plastics	33	10.5	29	10.9	51	13.4
Non-identifiable	51	16.2	46	17.2	67	17.5
Total	**315**	**100.0**	**267**	**100.0**	**382**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S8. Relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in water column samples.

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	4	2.5	0	0.0	2	1.9
EVA	0	0.0	1	0.9	2	1.9
PA	0	0.0	3	2.8	11	10.7
Polyester	16	10.2	10	9.3	18	17.5
PE	50	31.8	34	31.5	25	24.3
PE-PP	10	6.4	5	4.6	14	13.6
Polyisoprene	26	16.6	18	16.7	15	14.6
PP	7	4.5	5	4.6	9	8.7
PU	19	12.1	5	4.6	2	1.9
PS	5	3.2	0	0.0	0	0.0
PVC	4	2.5	17	15.7	2	1.9
Other plastics	16	10.2	10	9.3	3	3.0
Total	**157**	**100.0**	**108**	**100.0**	**103**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S9. Particles identified by spectroscopy in pearl oyster samples after digestion according to study site and their relative abundance. A total of 1,908 particles was analysed based on a sub-sampling procedure (Kedzierski *et al.*, 2019).

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	0	0.0	0	0.0	0	0.0
EVA	8	1.5	27	4.7	20	3.3
PA	0	0.0	11	1.9	0	0.0
Polyester	17	3.1	16	2.8	12	2.0
PE	8	1.5	38	6.7	15	2.5
PE-PP	9	1.6	9	1.6	10	1.7
Polyisoprene	0	0.0	0	0.0	0	0.0
PP	13	2.4	35	6.1	21	3.5
PU	0	0.0	0	0.0	0	0.0
PS	11	2.0	7	1.2	2	0.3
PVC	0	0.0	24	4.2	0	0.0
Other plastics	29	5.3	13	2.3	23	3.8
Coton	105	19.2	54	9.5	61	10.2
Lignin/Cellulose	30	5.5	18	3.2	47	7.8
Mineral compounds	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Pigment	15	2.7	65	11.4	36	6.0
Protein	17	3.1	41	7.2	39	6.5
Stearate	9	1.6	26	4.6	13	2.2
Other non-plastics	144	26.4	141	24.7	144	24.0
Non-identifiable	131	24.0	46	8.1	156	26.0
Total	**546**	**100.0**	**571**	**100.0**	**599**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S10. Relative abundance of synthetic polymers among identified microplastics in pearl oyster samples.

Polymer*	Ahe		Manihi		Takaroa	
	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)	Identified particle (item)	Relative abundance (%)
Acrylic	0	0.0	0	0.0	1	1.0
EVA	8	8.9	27	15.2	20	19.2
PA	3	3.3	11	6.2	4	3.8
Polyester	17	18.9	16	9.0	15	14.4
PE	8	8.9	38	21.3	15	14.4
PE-PP	9	10.0	9	5.1	10	9.6
Polyisoprene	1	1.1	0	0.0	3	2.9
PP	13	14.4	35	19.7	21	20.2
PU	11	12.2	7	3.9	2	1.9
PS	3	3.3	2	1.1	0	0.0
PVC	3	3.3	24	13.5	0	0.0
Other plastics	14	15.6	9	5.1	13	12.5
Total	**90**	**100.0**	**178**	**100.0**	**104**	**100.0**

*Excluding rayon polymer

Table S11. Relative contribution of polymer and sample type to the total Chi-square score.

Polymer	Ahe (χ^2 = 102.03)			Manihi (χ^2 = 109.39)			Takaroa (χ^2 = 102.03)		
	Surface water (%)	Water column (%)	Pearl oyster (%)	Surface water (%)	Water column (%)	Pearl oyster (%)	Surface water (%)	Water column (%)	Pearl oyster (%)
Acrylic	2.595	0.000	2.529	10.946	2.736	2.736	1.076	1.090	0.000
EVA	2.904	2.904	11.616	4.905	3.358	16.378	5.425	4.634	20.087
PA	0.340	1.301	2.970	0.147	0.377	0.995	0.101	1.3013	2.129
PE	5.495	1.076	11.434	1.789	0.045	2.401	4.221	0.0009	4.344
PE-PP	2.450	0.004	2.261	0.051	0.000	0.043	2.748	2.309	0.019
Polyester	1.789	0.319	3.618	0.726	0.149	0.217	7.383	1.031	2.896
Polyisoprene	1.705	12.438	4.933	3.443	17.56	5.452	2.073	9.360	2.623
PP	0.267	2.014	3.749	0.057	4.599	3.636	2.533	0.917	6.497
PS	0.001	0.001	0.000	2.019	0.332	0.714	0.615	0.149	0.159
PU	8.982	2.327	2.165	1.215	1.089	0.003	0.549	0.137	0.137
PVC	1.441	0.109	0.758	4.433	1.901	0.528	0.029	1.365	0.994
Other plastics	1.471	0.040	1.995	2.333	2.674	0.012	1.815	1.874	7.377

Table S12. Positive and negative associations between polymer and sample type.

Polymer	Ahe			Manihi			Takaroa		
	Surface water	Water column	Pearl oyster	Surface water	Water column	Pearl oyster	Surface water	Water column	Pearl oyster
Acrylic	1.627	-0.021	-1.607	3.460	-1.730	-1.730	-0.984	0.990	-0.006
EVA	-1.721	-1.721	3.443	-2.316	-1.916	4.233	-2.209	-2.041	4.250
PA	-0.589	-1.152	1.741	-0.401	-0.642	1.043	0.302	1.082	-1.384
PE	2.368	1.048	-3.416	1.399	0.221	-1.621	1.948	0.028	-1.977
PE-PP	-1.581	0.062	1.519	-0.237	0.019	0.218	-1.572	1.441	0.131
Polyester	-1.351	-0.571	1.921	0.891	-0.404	-0.487	2.577	-0.963	-1.614
Polyisoprene	-1.319	3.562	-2.243	-1.941	4.383	-2.442	-1.365	2.901	-1.536
PP	-0.522	-1.433	1.956	0.249	-2.243	1.994	-1.509	-0.908	2.417
PS	0.033	-0.034	0.000	1.486	-0.602	-0.884	0.743	-0.366	-0.378
PU	3.027	-1.541	-1.486	1.153	-1.091	-0.062	0.703	-0.351	-0.351
PVC	-1.213	0.333	0.879	-2.202	1.442	0.760	-0.162	1.108	-0.946
Other plastics	-1.225	-0.201	1.427	-1.598	1.710	-0.113	-1.278	-1.298	2.576

Table S13. Microplastic concentrations in surface water, water column and cultivated pearl oysters from Ahe, Manihi and Takaroa.

Study site	Sample	Total particle	Synthetic matter (%)	Total MP	Filtered volume (m^3)	MP concentration (item m^{-3})	Corrected MP concentration according to Kukulka *et al.* (2012)
Surface water							
Ahe	1	290	27.9	81	152.1	0.5	
Ahe	2	455	57.8	263	147.1	1.8	
Ahe	3	1672	61.9	1035	124.3	8.3	
Ahe	4	480	73.9	355	141.5	2.5	
Ahe	5	679	69.0	469	145.4	3.2	
Ahe	6	153	78.6	120	150.0	0.8	
Ahe	7	257	37.2	96	143.0	0.7	
Ahe	8	929	78.0	725	143.0	5.1	
Ahe	9	297	74.4	221	143.0	1.5	
Ahe	Pass (in)	1108	67.4	747	116.5	6.4	
Ahe	Pass (out)	369	78.6	290	151.3	1.9	
Manihi	1	290	53.8	156	132.8	1.2	
Manihi	2	523	33.3	174	169.6	1.0	
Manihi	3	400	43.9	176	157.5	1.1	
Manihi	4	428	60.5	259	167.3	1.5	
Manihi	5	688	46.3	319	163.9	1.9	
Manihi	6	714	55.8	399	149.8	2.7	
Manihi	7	652	83.3	543	65.1	8.4	
Manihi	8	1216	59.5	724	164.0	4.4	
Manihi	9	811	74.4	604	157.5	3.8	
Manihi	Pass (in)	952	41.9	399	84.3	4.7	
Manihi	Pass (out)	1163	32.6	379	75.5	5.0	
Takaroa	1	230	52.5	121	216.6	0.6	783.3
Takaroa	2	311	58.8	183	151.7	1.2	1,694.0
Takaroa	3	899	72.1	648	203.2	3.2	4,479.8
Takaroa	4	118	48.8	58	225.5	0.3	359.0
Takaroa	5	795	30.8	245	194.0	1.3	1,771.0
Takaroa	6	184	44.6	82	223.2	0.4	516.4
Takaroa	7	263	41.8	110	150.1	0.7	1,028.9
Takaroa	8	183	34.0	62	139.5	0.4	627.5
Takaroa	9	73	36.4	27	153.2	0.2	243.4
Takaroa	Pass (in)	221	33.3	74	184.1	0.4	562.1
Takaroa	Pass (out)	194	35.6	69	135.0	0.5	717.8
Water column							
Ahe	1	478	60.5	289	1.3	217.2	
Ahe	2	698	37.2	260	1.7	151.8	
Ahe	3	422	NA	NA	3.8	NA	
Ahe	4	803	26.7	214	2.9	75.1	
Ahe	5	169	61.0	103	4.7	22.1	
Ahe	6	453	53.5	242	3.7	65.4	

Ahe	7	311	54.5	170	4.0	42.5
Ahe	8	344	45.2	156	5.1	30.3
Ahe	9	472	44.2	209	3.7	56.3
Manihi	1	764	18.6	142	2.7	53.4
Manihi	2	680	20.0	136	2.6	53.0
Manihi	3	715	15.9	114	4.1	27.8
Manihi	4	708	60.0	425	3.3	127.7
Manihi	5	1008	32.6	328	3.5	93.3
Manihi	6	982	38.1	374	3.4	109.3
Manihi	7	1420	20.9	297	3.8	78.2
Manihi	8	1156	30.2	349	4.4	79.9
Manihi	9	1139	43.5	495	3.8	130.2
Takaroa	1	965	20.9	202	1.4	141.6
Takaroa	2	1271	42.9	545	0.8	716.2
Takaroa	3	833	31.7	264	1.7	154.3
Takaroa	4	521	30.2	158	4.3	36.8
Takaroa	5	463	25.0	116	1.9	60.9
Takaroa	6	708	22.7	161	4.3	37.6
Takaroa	7	381	12.2	46	3.3	14.0
Takaroa	8	287	32.6	93	3.3	28.1
Takaroa	9	276	19.5	54	2.4	22.7

Study site	**Sample**	**Total particle**	**Synthetic matter (%)**	**Total MP**	**Dry weight (dw, g)**	**MP concentration (item g^{-1} dw)**
Pearl oyster						
Ahe (pearl-farm 1)	1	129	9.8	13	4.5	2.8
Ahe (pearl-farm 1)	2	117	28.9	34	3.4	10.0
Ahe (pearl-farm 1)	3	133	19.0	25	3.9	6.5
Ahe (pearl-farm 1)	4	271	2.3	6	1.8	3.5
Ahe (pearl-farm 1)	5	393	22.5	88	2.1	41.9
Ahe (pearl-farm 1)	6	56	9.5	5	1.3	4.2
Ahe (pearl-farm 1)	7	63	17.1	11	1.3	8.1
Ahe (pearl-farm 2)	8	94	23.7	22	5.2	4.3
Ahe (pearl-farm 2)	9	104	13.9	14	3.8	3.8
Ahe (pearl-farm 2)	10	109	20.0	22	7.7	2.8
Ahe (pearl-farm 2)	11	76	17.1	13	4.0	3.2
Ahe (pearl-farm 2)	12	90	32.3	29	4.5	6.4
Ahe (pearl-farm 2)	13	100	13.2	13	5.0	2.6
Ahe (pearl-farm 2)	14	156	16.2	25	5.3	4.7
Manihi	1	665	31.7	211	1.7	125.0
Manihi	2	450	32.5	146	3.3	44.8
Manihi	3	224	9.8	22	3.8	5.7
Manihi	4	275	27.5	76	2.0	37.1
Manihi	5	1176	32.4	381	3.4	113.2
Manihi	6	751	19.4	146	3.1	47.6
Manihi	7	258	34.2	88	3.4	26.2
Manihi	8	449	48.5	218	4.2	52.4
Manihi	9	373	22.9	85	3.8	22.4

Manihi	10	346	40.6	141	2.9	48.9
Manihi	11	441	20.0	88	4.2	21.2
Manihi	12	370	33.3	123	5.6	22.0
Manihi	13	260	19.5	51	5.0	10.0
Manihi	14	263	57.5	151	5.9	25.6
Takaroa (pearl-farm 1)	1	598	24.4	146	2.7	54.2
Takaroa (pearl-farm 1)	2	369	26.2	97	2.3	41.1
Takaroa (pearl-farm 1)	3	355	25.6	91	3.1	29.6
Takaroa (pearl-farm 1)	4	135	8.7	12	3.7	3.2
Takaroa (pearl-farm 1)	5	139	23.3	32	3.6	9.0
Takaroa (pearl-farm 1)	6	161	16.3	26	1.7	15.5
Takaroa (pearl-farm 1)	7	382	13.6	52	3.6	14.5
Takaroa (pearl-farm 2)	8	153	22.7	35	1.2	28.6
Takaroa (pearl-farm 2)	9	112	15.4	17	1.1	15.5
Takaroa (pearl-farm 2)	10	85	12.8	11	1.5	7.3
Takaroa (pearl-farm 2)	11	81	18.2	15	0.6	25.2
Takaroa (pearl-farm 2)	12	94	4.7	4	2.1	2.1
Takaroa (pearl-farm 2)	13	89	9.5	8	0.9	9.1
Takaroa (pearl-farm 2)	14	138	4.9	7	0.9	7.3

3. Conclusion et perspectives

L'évaluation de la contamination microplastique dans les lagons perlicoles de Ahe, Manihi et Takaroa a démontré l'omniprésence de ces particules dans l'eau de mer et les tissus d'huîtres perlières en élevage. La colonne d'eau dans laquelle *P. margaritifera* est élevée s'est révélée être un compartiment écologique hautement contaminé. Par ailleurs, il serait intéressant d'obtenir des analyses à partir des échantillons de surface sur maille plus fine à 80 µm afin d'observer (ou non) une augmentation de la contamination avec la diminution de la taille (Erni-Cassola *et al.*, 2017). Cette démarche serait d'autant plus pertinente en réalisant des prélèvements à 40 µm pour effectuer une comparaison robuste entre les deux compartiments écologiques (*i.e.* surface *vs* colonne d'eau) (Lindeque *et al.*, 2020). Aussi, les résultats ont démontré que les MP dans l'eau de mer étaient dominés par des fragments (*i.e.* MP secondaires) de type PE compris dans une gamme de taille allant de 20 à 200 µm. Les caractéristiques de cette contamination de l'eau de mer étaient similaires à celles retrouvées dans les tissus d'huîtres avec en plus du PE, une abondance plus importante de MP de type PP et éthylène vinyl-acétate (EVA). Les MP identifiés et analysés étaient en grande majorité de couleur noire et dominés par les polymères de type PE, PP et co-polymère PE-PP. Cela rappelle les cordes et les collecteurs de naissains collectés *in situ* qui sont majoritairement de couleur noire et qui ont été identifiés comme étant à la fois du PE et du PP. Ces deux structures perlicoles sont retrouvées en abondance parmis les déchets présents sur les plages (**Figure 29** ; préambule) et pourraient donc contribuer de manière significative à la contamination en MP de type PE et PP. Cependant, d'autres campagnes d'échantillonnages ainsi que des analyses plus fines (*e.g.* analyses chimiques) sont requises pour démontrer les sources réelles de MP et déterminer l'implication de la perliculture dans cette contamination des lagons perlicoles de Polynésie française. En effet, d'autres activités comme la pêche mais également le tourisme et les activités domestiques pourraient contribuer à cette contamination, qui seraient donc variables localement entre les lagons suivant les activités et le nombre d'habitants. Il serait ainsi pertinent d'analyser un grand nombre de lagons (avec potentiellement moins de points de suivi par lagon) pour multiplier les sites d'étude, en mettant en covariable le nombre d'habitants, le nombre de filières d'élevage, la pression touristique, les mesures de gestion des déchets, etc., de sorte à adopter une approche type épidémiologique pour mieux appréhender les différentes sources (Pernet *et al.*, 2018). Par ailleurs, ces travaux confirment les inquiétudes des autorités locales et interpellent quant aux menaces qui pèsent sur *P. margaritifera* et plus largement sur l'écosystème lagonaire. Des études en conditions contrôlées de laboratoire sont nécessaires pour appréhender ce risque émergent et prévoir les impacts potentiels sur la durabilité de l'huître perlière et plus largement la perliculture.

CHAPITRE IV

IMPACT DES MICROPLASTIQUES STANDARDISÉS DE LABORATOIRE SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE

CHAPITRE IV : IMPACT DES MICROPLASTIQUES STANDARDISÉS DE LABORATOIRE SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE

1. Préambule

La première expérimentation en laboratoire visant à évaluer l'impact des MP sur l'huître perlière reposait sur un dispositif d'exposition des animaux à des microbilles de polystyrène (micro-PS) de 6 et 10 µm pendant deux mois. L'exposition avait pour but de s'approprier la méthodologie expérimentale, fort d'expériences déjà réalisées au LEMAR sur des bivalves marins tempérés, et d'appréhender le risque associé aux MP en évaluant leurs effets sur les réponses physiologiques et transcriptomiques de *P. margaritifera*. Pour répondre à ces objectifs, l'utilisation de MP standards s'avère avantageuse pour leur fourniture et leurs caractéristiques (*e.g.* tailles homogènes, concentration et nombre de particules connus, traçabilité). Ces caractéristiques sont primordiales pour élaborer un dispositif expérimental rigoureux et fiable permettant de contrôler l'ensemble des paramètres d'exposition (*e.g.* concentrations théoriques *vs* réelles). Ainsi, des microbilles de polystyrène (micro-PS) transparentes de 6 et 10 µm de diamètre (**Figure 33**) ont été commandées chez un laboratoire spécialisé (Polyscience, Polybead® ; Washington) et utilisées pour cette expérimentation.

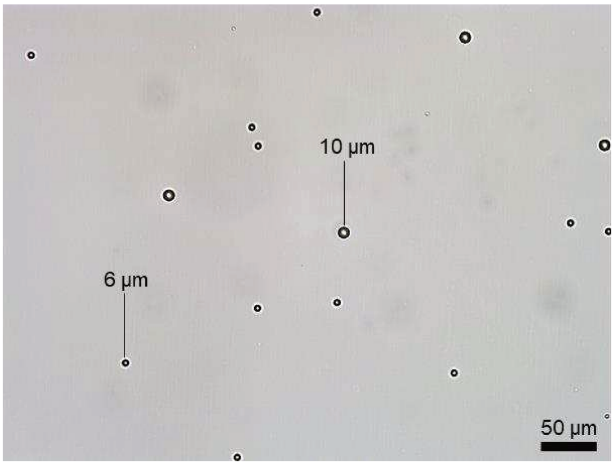


Figure 33. Microbilles de polystyrène (micro-PS) de diamètre 6 et 10 µm.

Trois concentrations ont été testées : 0,25 ; 2,5 et 25 µg.L^{-1} contre un témoin. La dose maximale de 25 µg.L^{-1} correspond à la concentration massique maximale mesurée en Mer Méditerrannée (*i.e.* 23 µg.L^{-1}) par Collignon *et al.* (2012) et préalablement testée expérimentalement par nos collègues de l'UMR LEMAR de Brest sur l'huître creuse *C. gigas*

(Sussarellu *et al.*, 2016) et la moule *M. edulis* (Paul-Pont *et al.*, 2016). Dans notre étude, deux autres concentrations ont été testées en abaissant la dose maximale d'un facteur 10 (2,5 $\mu g.L^{-1}$) et 100 (0,25 $\mu g.L^{-1}$). Ainsi, ce dispositif expérimental a permis de tester un effet-dose pour potentiellement déceler une fenêtre de réponse au stress MP et affiner une liste de « end-points » à mesurer en réponses à ces expositions. Ces différentes doses de micro-PS ont été distribuées en continu (circuit ouvert) aux huîtres perlières associées à un cocktail de microalgues classiquement utilisées en expérimentation *in vivo* (*i.e. Tisochrysis lutea* [*T-iso*] et *Chaetoceros gracilis*). Cette distribution était assurée par une pompe péristaltique puisant le mélange microalgues/micro-PS dans un bac spécifique à chaque condition et l'acheminant par un réseau de distribution (tuyaux) vers les bacs d'exposition.

La mise en place de ce dispositif d'exposition a soulevé plusieurs aspects techniques et méthodologiques. La quantification des micro-PS à l'entrée des bacs d'exposition s'est avérée être un challenge technique du fait des faibles concentrations et de la nature des microbilles utilisées. En effet, pour s'affranchir des effets toxiques que peuvent occasionner les fluorochromes (Alford *et al.*, 2009), le choix de la nature des MP s'est tourné vers des microbilles transparentes plutôt que des microbilles fluorescentes. Pourtant, les micro-PS transparentes présentent l'inconvénient d'être moins visibles que les fluorescentes et donc plus difficiles à tracer. Le suivi de la distribution du mélange microalgues/micro-PS a néanmoins été possible par comptage sur cellule Agasse-Lafont ainsi qu'au compteur de particules (Multisizer^{TM} 3 coulter counter, Beckman Coulter). Cependant, un inconvénient technique notable a pu être soulevé concernant la distribution des microalgues associées aux micro-PS. Comme le montre la **Figure 34**, les micro-PS de 6 µm ont une taille proche de celles des cellules de *C. gracilis*, rendant la distinction difficile. Bien que les micro-PS transparentes soient reconnaissables par leur forme sphérique et leur réfringence sous lumière blanche, cette caractéristique n'est pas prise en compte par le compteur de particules, ce qui représente un biais dans le suivi des micro-PS présents dans le mélange (**Figure 35**A). Ainsi, cette approche automatisée nécessite que les microalgues et les MP soient distribués séparément (**Figure 35**B-C). Un autre paramètre important concerne les phénomènes de rétention des micro-PS dans les tuyaux de distribution qui peuvent agir sur les paramètres d'exposition. Ces phénomènes interviennent (i) dès le début dans des conditions de tuyaux « propres » (**Figure 36**A) probablement à cause des intéractions électrostatiques liées à leur nature (silicone) puis (ii) progressivement au fur et à mesure que la paroi interne des tuyaux s'encrasse (**Figure 36**B). Ainsi, les concentrations de solution mère de micro-PS ont été ajustées et augmentées d'environ 13% de sorte à atteindre les concentrations théoriques désirées à l'entrée des bacs d'exposition (**Figure 36**A). De plus, comme le montre le suivi de distribution des micro-PS à l'entrée des bacs d'exposition (**Figure 36**B), un nettoyage du réseau de distribution a été effectué tous les 5 jours pour maintenir les bonnes concentrations autour des huîtres.

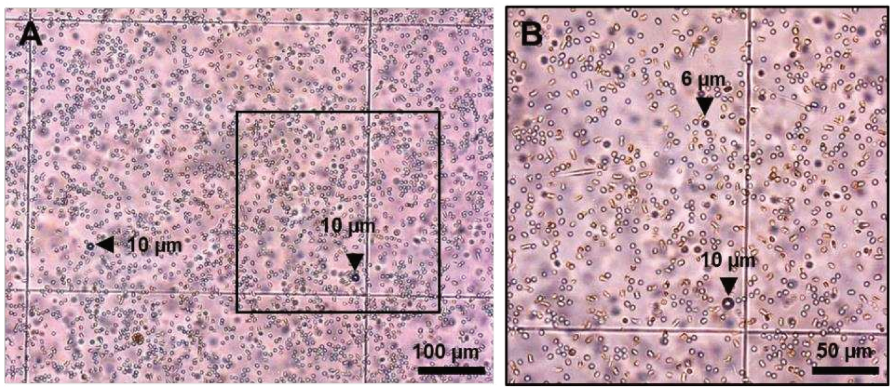


Figure 34. Aperçu des micro-PS comptabilisées (sur lame Agasse-Lafont) à l'entrée des bacs d'exposition. Identification des micro-PS 10 µm au microscope optique au grossissement × 200 (**A**) et identification des micro-PS 6 µm au grossissement × 400 (**B**). La photographie B est un agrandissement du cadre noir de la photographie A.

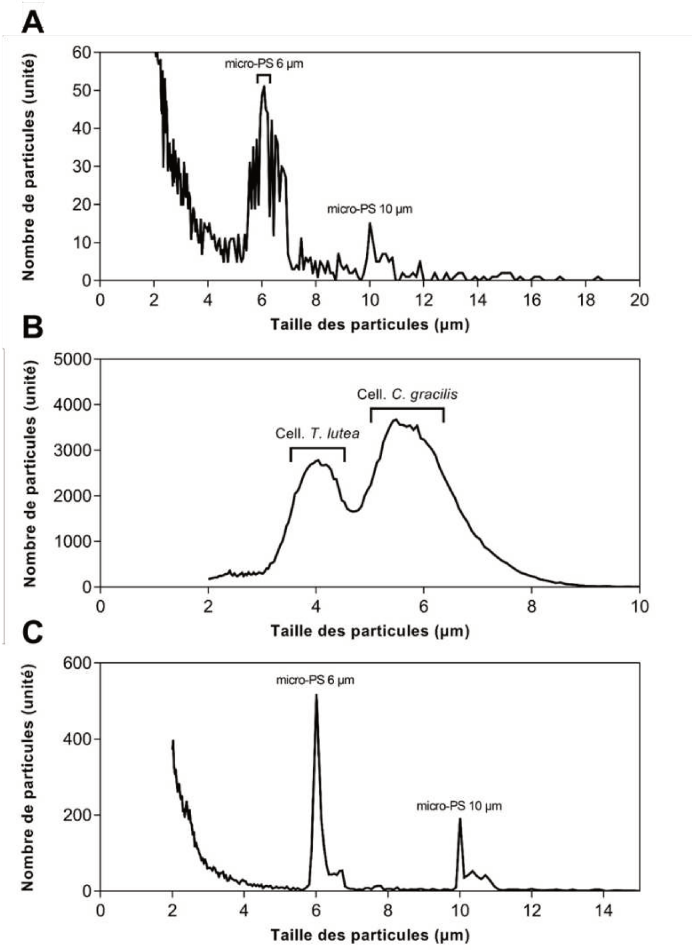


Figure 35. Analyse d'échantillons au compteur de particules (Multisizer^{TM}). (**A**) Échantillon correspondant au mélange microalgues/micro-PS prélevé à l'entrée des bacs d'exposition (condition 25 µg.L^{-1}) ; (**B**) échantillons de microalgues et (**C**) de micro-PS (solution mère) destinés au mélange microalgues/micro-PS. Volume analysé : 10 ml. Cell. *T. lutea* : pic représentant les cellules de *Tisochrysis lutea* ; Cell. *C. gracilis* : pic représentant les cellules de *Chaetoceros gracilis*.

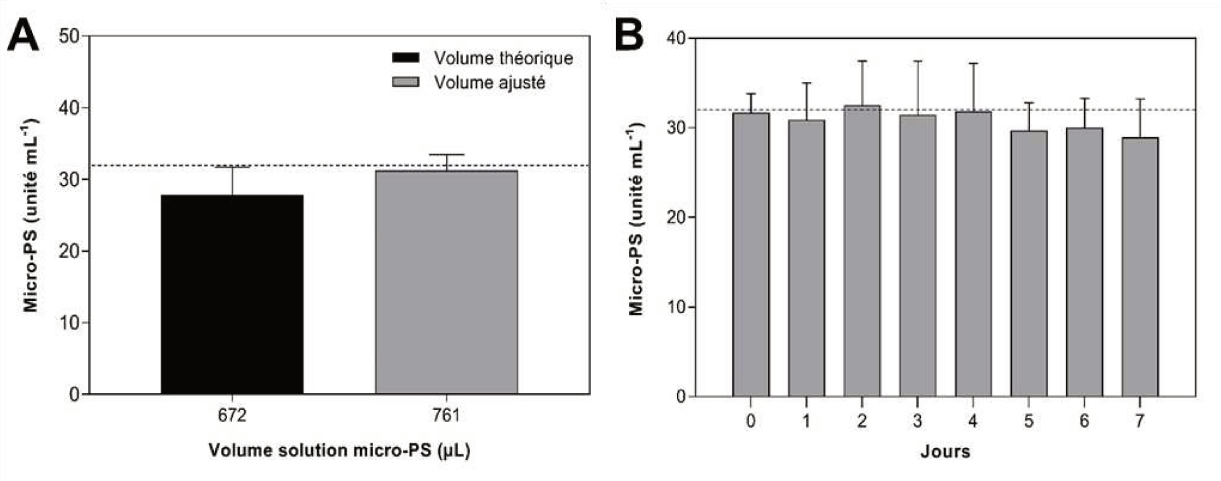


Figure 36. Suivi de la distribution des micro-PS à l'entrée des bacs d'exposition (condition 25 µg.L^{-1}). (**A**) Ajustement du volume de solution mère de micro-PS incorporé quotidiennement dans les bacs de mélange microalgues/micro-PS pour atteindre la concentration désirée (barre pointillée); (**B**) comptages et suivi journalier sur une semaine après nettoyage des tuyaux de distribution à J0. La barre pointillée représente le nombre théorique de micro-PS.ml^{-1} (*i.e.* 32 micro-PS.ml^{-1}). Moyenne (n = 3) ± écart-type.

Une fois le dispositif expérimental mis au point et les huîtres acclimatées, l'impact des micro-PS sur la physiologie de *P. margaritifera* a pu être évalué grâce à un suivi individuel mené dans un banc de mesures métaboliques. Des mesures d'ingestion, de respiration et d'efficacité d'assimilation ont permis de dresser le bilan énergétique de chaque individu (Scope For Growth, SFG). Les effets sur l'effort de reproduction et la dynamique de la gamétogénèse ont également été évalués. Les résultats de cette première expérimentation ont démontré un impact important des micro-PS sur le bilan énergétique des animaux avec des répercutions au niveau de la gamétogénèse. Ce travail a fait l'objet d'une publication (article 2) dans la revue scientifique *Environmental Science & Technology* (facteur d'impact 2018 : 7.149) :

Environmental Science & Technology

Article

Cite This: *Environ. Sci. Technol.* XXXX, XXX, XXX−XXX

pubs.acs.org/est

Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon,* Céline Reisser, Claude Soyez, Virgile Quillien, and Gilles Le Moullac*

Ifremer, UMR Ecosystèmes Insulaires Océaniens (EIO), UMR 241 UPF/ILM/IRD/Ifremer, Centre du Pacifique, BP 49, 98719, Taravao, French Polynesia

Au vu des résultats métaboliques et afin de décrypter les mécanismes moléculaires impactés de la manière la plus exhaustive possible, une approche transcriptomique a été conduite sur les individus exposés aux micro-PS. Elle avait également pour objectif de rechercher les conséquences de cette exposition sur des fonctions énergétiques coûteuses telle que la biominéralisation. Ainsi, à la fin de cette expérimentation, le manteau de 10 individus par condition a été prélevé et conservé à –80°C. L'ARN total a été extrait des échantillons et l'ARNm a été séquencé. Les données de séquençage ont ensuite été analysées par traitements bioinformatiques dans le cadre d'un stage de M2 effectué par Lucie Morvan (Université de La Rochelle) et encadré par Jérémy Le Luyer (cadre de recherche en génomique fonctionnelle) et moi-même. Les résultats de cette approche transcripomique n'ont révélé aucune altération de l'expression des gènes impliqués dans la biominéralisation. En revanche, une modulation des niveaux d'expression a été observée pour des gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification, et de défenses antioxydantes et immunitaires. Ces réponses moléculaires se sont révélées dose-spécifiques et étroitement liées aux capacités énergétiques des animaux. Ce travail a fait l'objet d'une seconde publication (article 3) dans la revue scientifique *Environmental Pollution* (facteur d'impact 2020 : 6.792) :

Environmental Pollution 266 (2020) 115180

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon [a, 1], Lucie Morvan [a, 1], Arnaud Huvet [b], Virgile Quillien [a, b], Claude Soyez [a], Gilles Le Moullac [a], Jérémy Le Luyer [a, *]

[a] Ifremer, Institut Louis-Malardé, IRD, Univ Polynésie Française, EIO, F-98719, Taravao, Tahiti, Polynésie française, France
[b] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

2. Article 2 (publié) – *Environmental Science & Technology*

Microplastics affect energy balance and gametogenesis in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon *, Céline Reisser, Claude Soyez, Virgile Quillien, Gilles Le Moullac *

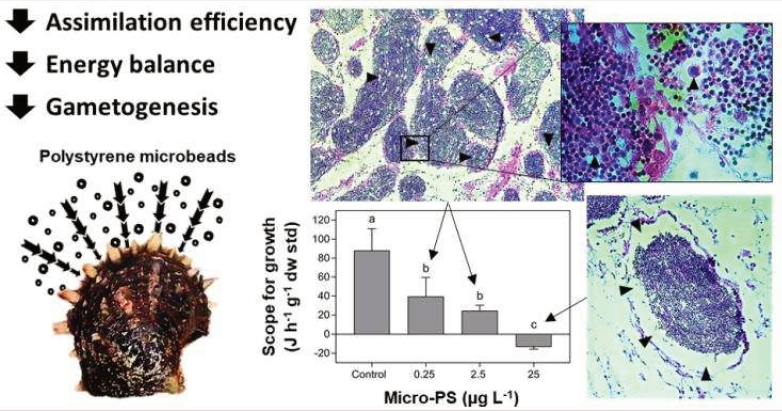
Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

* *Corresponding author*

Abstract

Plastic pollution in the environment is increasing at global scale. Microplastics (MP) are derived from degradation of larger plastic items or directly produced in microparticles form (< 5 mm). Plastics, widely used in structures and equipments of pearl farming, are a source of pollution to the detriment of the lagoon ecosystem. In order to evaluate the impact of MP on the physiology of *Pinctada margaritifera*, a species of ecological and commercial interests, adult oysters were exposed to polystyrene microbeads (micro-PS of 6 and 10 µm) for 2 months. Three concentrations were tested: 0.25, 2.5, 25 µg L^{-1} and a control. Ingestion and respiration rate and assimilation efficiency were monitored on a metabolic measurement system to determine the individual energy balance (Scope For Growth, SFG). Effects on reproduction were also assessed. The assimilation efficiency decreased significantly according to micro-PS concentration. The SFG was significantly impacted by a dose-dependent decrease from 0.25 µg L^{-1} ($p < 0.0001$), and a negative SFG was measured in oysters exposed to 25 µg L^{-1}. Gonads may have provided the missing energy to maintain animals' metabolism through the production of metabolites derived from germ cells phagocytosis. This study shows that micro-PS significantly impact the assimilation efficiency and more broadly the energy balance of *P. margaritifera*, with negative repercussions on reproduction.

Graphical abstract



Introduction

Through their immense potential and countless properties, plastics hold a highly prevalent place in contemporary society. Plastic production increased dramatically worldwide over the last 60 years, increasing from 0.5 million tons per year in 1960 to 322 million tons in 2015 (PlasticsEurope, 2016). About 5-10% of this annual plastic production is rejected in the marine environment (Jambeck *et al.*, 2015), and their degradation can take several hundred years (Barnes *et al.*, 2009). Microplastics (MP, plastic particles <5 mm; Arthur *et al.*, 2009) can be defined as primary MP or secondary MP, depending on their origins (Barnes *et al.*, 2009). The majority of MP found in the oceans are secondary MP produced through the fragmentation of larger items under the action of biotic (*i.e.* biodegradation) and abiotic factors (*e.g.* photolysis, hydrolysis, thermooxidative and thermal degradation) (Andrady, 2011). By opposition, primary MP are directly released into the environment as microparticles, and come from industrial sources (*e.g.* toothpaste, manufactured products from cosmetic industry, or macroplastic manufacturing base) (Andrady, 2011).

Given their ubiquitous nature and small dimensions, MP are likely to be ingested by many organisms (Derraik, 2002; Thompson, 2004; Ng and Obbard, 2006; Barnes *et al.*, 2009; Fendall and Sewell, 2009) inducing various physical and biological effects (Rochman *et al.*, 2016), especially in several filter-feeding species such as bivalves (Browne *et al.*, 2008; Avio *et al.*, 2015a; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Sussarellu *et al.*, 2016), sea cucumbers (Graham and Thompson, 2009), lugworm (Besseling *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013a) and zooplankton (Lee *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2013, 2015a; Jeong *et al.*, 2016). MP ingestion substantially impacts key physiological functions such as nutrition (Murray and Cowie, 2011; Cole *et al.*, 2013; Watts *et al.*, 2015), assimilation efficiency (Blarer and Burkhardt-Holm, 2016), respiration (Rist *et al.*, 2016), reproduction (Besseling *et al.*, 2014; Sussarellu *et al.*, 2016), growth (Watts *et al.*, 2015) and survival (Wright *et al.*, 2013b; Rist *et al.*, 2016). For example, in a chronic

4-weeks exposure to microfibers (1-5 mm in length, 1% plastic diet), the crab *Carcinus maenas* showed reduced food consumption (from 0.33 to 0.03 g d^{-1}) and a significant reduction in energy available for growth (scope for growth) from 0.59 to -0.31 kJ crab d^{-1} (Watts *et al.*, 2015). In addition to physical effects (*e.g.* induction of a false sense of satiety, alteration of feeding capacity, digestive tract obstruction) (Murray and Cowie, 2011; Cole *et al.*, 2013, 2015a), ingested MP can also result in reserves depletion (Wright *et al.*, 2013a), hepatic stress (Rochman *et al.*, 2013b), and reduced fecundity (Lee *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2015a). At the cellular and molecular level, MP can be translocated in the circulatory system (Browne *et al.*, 2008), induce oxidative stress (Jeong *et al.*, 2016), neurotoxic effects, genotoxicity and alter immunological responses (Avio *et al.*, 2015a) after desorption of persistent organic pollutants (Bakir *et al.*, 2014a; Paul-Pont *et al.*, 2016).

While the quantification of MP in seawater is very difficult, their potential ingestion by species of economical and commercial interest is a cause for concern. This is especially true for bivalves, since many are world-wide exploited species, and are suspension filter-feeding organisms, directly exposed to MP present in the water column (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). A recent study examined the effects of MP on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by exposing the animals to fluorescent polystyrene microbeads (micro-PS of 2 and 6 µm diameter, 23 µg L^{-1}) over a 2-months period (Sussarellu *et al.*, 2016). This study revealed a significant impact of MP on the reproduction of exposed oysters through a marked decrease in fertility (–41%), oocyte number (–38%) and size (–5%); as well as a decline in spermatozoa mobility (–23%). Furthermore, larvae produced by exposed oysters showed a delayed growth of about 20% (Sussarellu *et al.*, 2016). This recent work highlights the reprotoxic effects of MP on *C. gigas*, and a transgenerational effect by altering the development of the next generation of individuals produced by breeders exposed to MP. The dose tested in this study (*i.e.* 23 µg L^{-1}) referring to a mass concentration in the range of the highest estimated field concentration >333 µm, from manta trawl sampling in North Western Mediterranean Sea (Collignon *et al.*, 2012). Although this dose is likely to be higher than the mean concentrations encountered in the natural environment (even if environmental doses are unknown at this range of sizes, *i.e.* 2 and 6 µm; Huvet *et al.*, 2016), the long-term consequences of MP are of concern for oyster related economy.

In French Polynesia (FP), pearl farming occupies an important part in the economical, environmental and social landscape of the territory. The pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, is a tropical species of economical interest for the trade of pearls and mother-of-pearl. It is also a species of ecological interest and serves as a biological model for lagoon ecosystems and environmental survey. Indeed, as most of filter-feeding organisms, oyster plays a predominant role in the benthic and pelagic ecosystems junction by exercising a local control on nutrient cycle and primary productivity (Barbier *et al.*, 2011). In comparison with other bivalves, *P. margaritifera*

has particularly high filtration rates, and can filter up to 26 L seawater per hour (Pouvreau *et al.*, 1999). It can feed on a wide range of particle sizes (2 to 200 µm), with an optimal retention rate for particles of 5 µm and over (Pouvreau *et al.*, 1999). As many filter-feeding species, the pearl oyster removes particulate matter from water column and transfers them to the sediment as biodeposits. Biodeposition is probably a key mechanism by which neutral buoyancy MPs are transported from water column to sediments (Cole *et al.*, 2016). The pearl oyster could therefore affect MP distribution and concentration, which could alter algal communities and benthic macrofauna (Green, 2016), and thus disrupt the biological balance of lagoon ecosystem.

In recent years, the economic decline of pearl farming led to concessions closures, which are sometimes abandoned with all the remaining structures still in the lagoon. In addition, operational concessions are also leaving their inoperative farming structures in the lagoon, by drowning them (Andréfouët *et al.*, 2014), generating its own risk regarding the impact of MP on the local environment and economy. The inventory carried out by Andréfouët *et al.* (2014) in the pearl lagoon of Ahe atoll (FP) revealed large quantities of synthetic ropes, collectors, fencing, buoys and nylon cords (Andréfouët *et al.*, 2014). These breeding structures, essentially made of plastics, could represent a considerable source of MP, and more so considering the semi-closed environment of some cultured lagoons which could favour MP concentration (Andréfouët *et al.*, 2014). The related proximity to the South Pacific subtropical gyre may also contribute to MP contamination in French Polynesia waters (Eriksen *et al.*, 2013). A recent study has estimated a mean MP concentration of 0.74 pieces m^{-2} surface area in Moorea (FP) water column (Connors, 2017). Although MP contamination of Polynesian waters also likely comes from open sea and local industries, pearl farming might be generating its own risk regarding the impact of MP on the local environment and economy.

This study investigated the impacts of polystyrene microbeads (micro-PS 6 and 10 µm) on *P. margaritifera* by evaluating their effects on the individual energy budget, which gathers the ingestion, respiration and assimilation efficiency responses. Effects on reproduction were also discussed by the analysis of individual reproductive effort and the gametogenesis condition. Three main questions were posed: (1) what is the effect of microplastics on the physiology of the pearl oyster? (2) How is the energy managed and allocated between the basal metabolic rate and the reproduction? (3) Are the oyster's responses dose-dependent, and is there a threshold? To meet these objectives and target a response window with dose-effect relationship, a 2-month exposure of adult oysters to 3 micro-PS doses (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) was performed under controlled conditions. To our knowledge, this is one of the first studies investigating a specific dose-effect of microplastics on the energy available for growth (scope for growth) and reproduction in exposed marine organisms.

Material and methods

Experimental animals and acclimation

Pearl oysters were sampled on October 17, 2016 in a pearl farm located in the Arutua atoll (15°14′43″S; 146°36′43″W), in the Tuamotu archipelago (French Polynesia, FP). A stock of approximately 350 adult oysters (1-1.5 years old; height, 5.9 ± 0.41 cm; weight, 25.2 ± 4.9 g, mean ± SD) were transferred (transfer authorization No. 3761 issued by the Ministry of Marine Resources of French Polynesia) to the lagoon of Vairao (Ifremer marine concession No. 8120/MLD: 17°48′26.0″S, 149°18′14.4″W, Tahiti, FP) on October 19, 2016. Before being packaged and transferred, all oysters were carefully inspected, cleaned and treated with saline water to remove parasites.

Polystyrene microbeads

Polystyrene is one of the most commonly used plastic polymers worldwide, often found in MP sampled in marine ecosystems (Barnes *et al.*, 2009). Dependent on the optimum retention rate of pearl oysters, we used unlabeled polystyrene microbeads (micro-PS) with diameters of 6 and 10 µm, purchased from Polyscience (Polybead®, Washington, PA, U.S.). Micro-PS of 6 and 10 µm were packaged in aqueous solution (Milli-Q® water) at a concentration of 2.10×10^{8} (2.5% w/v, 5 ml) and 4.55×10^{7} (2.5% w/v, 5 ml) particles ml^{-1} respectively. The two solutions were mixed in order to obtain a stock solution (10 ml) containing the two microbead diameters at equal weight. Polymer type of virgin micro-PS was confirmed using a Raman micro-spectroscopy analysis (**Figure S1** in the Supporting Information, SI). A fragment of additive-free reference polystyrene supplied by GoodFellow Cambridge Ltd (Lille, France) was used as spikes for the spectra comparison and measurements were carried out using a LabRAM HR800 Raman micro-spectrometer (Horiba Scientific), equipped with a Horiba Scientific ParticleFinder module for LabSpec6.

In vivo exposure

To assess the dose-effect of MP on the physiology and reproduction of *P. margaritifera*, oysters were exposed to 3 doses of micro-PS over a 2-month period: 0.25, 2.5, 25 µg L^{-1} (3.2×10^{2}, $\times10^{3}$, $\times10^{4}$ particles L^{-1}, respectively) and were compared to a control (0 µg L^{-1}) (**Figure 1**). After acclimation (2 weeks of depuration), oysters were conditioned in 4 experimental 20-L tanks per treatment (6 oysters per tank, *i.e.* 24 oysters per treatment). The tanks seawater supply (natural seawater pumped from the lagoon) was mechanically filtered on 25 and 5 µm sock filters. In each tank, a system of 2 air-lifts connected to the pressurized air circuit maintained the

homogeneity of the medium. Micro-PS of 6 and 10 µm were incorporated at equal weights according to the different tested doses (micro-PS ratio 6/10 µm: 4.614), and were injected continuously in the experimental design associated with a mixed diet of two microalgae (*Tisochrysis lutea*, formerly *Isochrysis galbana*, Tahitian strain: *T-Iso,* and *Chaetoceros gracilis*) at a daily ratio equal to 7-8% dry-weight-algae/dry-weight-oyster. The ration was determined according to the threshold for triggering pseudo-faeces production, so as to avoid an overestimation of ingestion measurements. This resulted in a mean concentration of 35 to 40 cells μl^{-1} in the water surrounding the oysters. The micro-PS/microalgae mixture was made every 24 hours in four 50-L cylindro-conical tank (1 per treatment). To avoid agglutination, micro-PS particles were preliminary mixed with Tween-20 at 10% of the micro-PS stock solution volume before being supplied to tanks. Tween-20 was also supplied to the control tank at the same rate (7 µl) as for the lowest micro-PS concentration (*i.e.* 0.25 µg L^{-1}). For each treatment, the microbeads and algae mixture was adjusted to 40 L with filtered (25 and 5 µm) seawater. The mixture was distributed by a peristaltic pump (16-way head, Ismatec®) set at 75 turns min^{-1}, *i.e.* 1.5 L of injected mixture per hour into the seawater supply of each 4 treatments for a total flow of 28 L h^{-1} (*i.e.* 7 L h^{-1} $tank^{-1}$). Oysters were maintained at 28.9 ± 0.3 °C under a 12 h light: 12 h dark cycle throughout the duration of the exposure. The pH, dissolved oxygen and salinity of the seawater were 8.2, 6.6 ± 0.7 mg O_2 L^{-1} and 35 psu, respectively. In order to avoid contamination of the natural environment with microbeads, discharges were filtered successively on 5 and 1 µm sock filters.

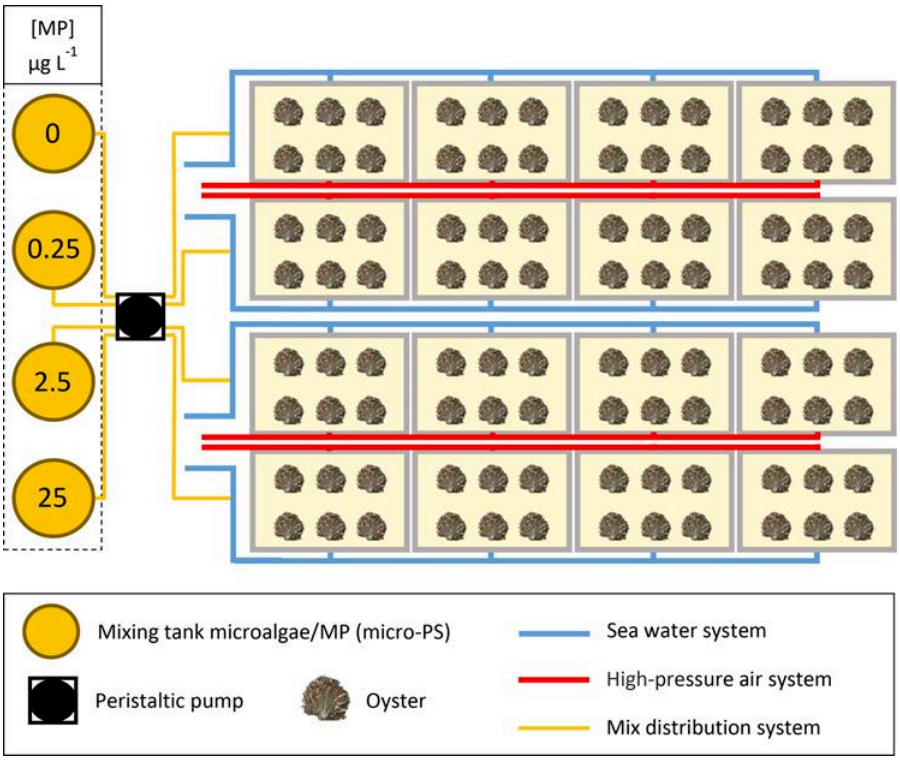


Figure 1. Experimental exposure device of oysters to microplastics.

Ecophysiological measurement system

After 1-month exposure, four oysters per treatment were placed in the ecophysiological measurement system (EMS) to monitor clearance rate and oxygen consumption. The EMS consisted of five hemispheric open-flow chambers in transparent Altuglas®. One oyster was placed in each chamber and the fifth chamber was occupied by an empty oyster shell to be used as control (Chávez-Villalba *et al.*, 2013). Experimental conditions during *in vivo* exposure were replicated in the EMS during measurements. For this, the chambers contained water at the same temperature (mean of 28.5 ± 0.3 °C) and concentration of algae as in the treatment tanks. Flow rates in the chambers were constant at 12 L h^{-1}. Each chamber was equipped with a two-way electromagnetic valve activated by an automaton. When the valve of one measuring chamber was opened, the released water was analysed for 3 min using a fluorometer (10-AU™, Turner Designs, Sunnyvale, CA) to measure microalgae fluorescence, then an oximeter (OXI 538/CellOX® 325, WTW, Weilheim, Germany) to measure dissolved oxygen. Data on clearance rate and oxygen consumption were stored on a computer with an acquisition software (computer programming by National Instruments™) and each cycle was completed within 3 min and another cycle started in the control chamber for 3 min (sequence: chamber 1, control, chamber 2, control, chamber 3, etc.). Oysters remained in the chambers for at least 48 h; measurements of each oyster were taken every 24 min until 120 measurements of clearance rate and oxygen consumption had been recorded (Chávez-Villalba *et al.*, 2013). A total of 32 oysters were individually monitored in the EMS (8 oysters per treatment). Assimilation efficiency was measured after collecting biodeposits (*i.e.* faeces) in each hemispheric chamber and 50 ml of microalgae mixture administered during ecophysiological measurements.

Ingestion Rate (IR)

IR is an indicator of feeding activity, and is defined as the quantity of microalgae cleared per unit of time. IR was estimated using fluorescence measurements and calculated as: $IR = V \times (C_1 - C_2)$, where C_1 is the fluorescence level of the control chamber, C_2 is the fluorescence of the experimental chamber containing one oyster, and V is the constant water flow rate (12 L h^{-1}) (Chávez-Villalba *et al.*, 2013).

Oxygen Consumption rate (OC)

OC was measured (mg O_2 h^{-1}) by calculating the differences in OC between the control and experimental chambers: $OC = V \times (O_1 - O_2)$, where O_1 is the oxygen level in the control chamber, O_2 is the oxygen level in the experimental chamber, and V is the water flow rate (Chávez-Villalba *et al.*, 2013).

Ingestion and oxygen consumption rates were estimated and an average calculated for each oyster, taking into account all values recorded after the measurements to stabilize. To compare IR and OC, it was necessary to correct for differences in specimen weight. Values of the ecophysiological activities were converted to a standard animal basis (1 g, dry weight), using the formula: $Ys = (Ws/We)^b \times Ye$, where *Ys* is the physiological activity of a standard oyster, *Ws* is the dry weight of a standard oyster (1 g), *We* is the dry weight of the specimen, *Ye* is the measured physiological activity, and *b* is the allometric coefficient of a given activity. The average *b* allometric coefficients were 0.66 for ingestion rate and 0.75 for oxygen consumption rate (Savina and Pouvreau, 2004).

Assimilation Efficiency (AE)

AE of organic matter was assessed by analysing microalgae and faeces according to the method of Conover (1966) and described by Chávez-Villalba *et al.* (2013). Biodeposits of each individual were treated individually by filtration on a GF/C filter (1.2 µm of porosity, Ø 47 mm, Whatman®) previously burned at 450 °C and weighed. Filters were then dried at 60 °C for 24 h in order to obtain the dry weight of biodeposits (DW) and then burned (Thermolyne™ Type 47900 & 48000 Furnaces, Thermo Scientific™) at 450 °C for 4 h to obtain the weight of the mineral matter (W_{MM}). The weight of organic matter (W_{OM}) biodeposits was obtained by difference between DW and W_{MM}. The W_{OM} of the food ration was calculated in the same way from the mixture of microalgae. Microalgae organic matter was obtained by filtering 50 ml of the microalgae mixture and followed by treatment of biodeposits according to the same procedure as for organic waste.

A micro-PS quantification in faeces was realised in order to refine assimilation values. The estimation of the micro-PS share in the W_{OM} of biodeposits was obtained during a specific experiment. The method used in this study is based on a digestion protocol of the OM with potassium hydroxide (KOH) (Foekema *et al.*, 2013), adapted by Dehaut *et al.* (2016). Oysters were isolated at the end of the exposure (J60) in order to avoid the contamination of faeces by micro-PS present in the media. Oysters were regrouped according to their treatment (18 per treatment) in 5 L Pyrex crystallizing dishes filled with filtered sea water. After 12 hours, faeces were taken using a plastic pipette (Deutscher) and poured into glass tubes. Biodeposits were homogenized and fractionated into two equal volumes: fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2). F1 was directly filtered on a GF/C filter as described previously, while F2 underwent 24 h digestion with potassium hydroxide (10% KOH) at 60 °C, in order to digest the OM and only conserve the micro-PS (Dehaut *et al.*, 2016). F2 was then filtered on a polycarbonate filter (3 µm of porosity, Ø 47 mm, ipPORE™ Track Etched Membrane, itip®). These filters were rinsed with acetic acid (90%) to clean any residual substances resulting from saponification due to KOH treatment. The two

filters were dried, and the filter F1 was burned and then weighed in order to obtain the W_{OM} of F1. The filter F2 was analyzed under a microscope and 6 areas were selected randomly and photographed to count the micro-PS. The average of the counts obtained was then scaled to the entire filter surface in order to estimate the total number of micro-PS in the sample and their contribution to the W_{OM} of F1 for each treatment (micro-PS weight 6 and 10 µm = 1.19×10^{-4} and 5.48×10^{-4} µg). This proportion of micro-PS was then subtracted in proportion to the individual DW biodeposits for each treatment. After conversion of the W_{OM} biodeposits and W_{OM} microalgae to relative values, the assimilation efficiency (AE, %) was calculated by the relation (Conover, 1966): $AE = (\%OM_m - \%OM_w) / ((100 - \%OM_w) \times \%OM_m)$, where AE is the assimilation efficiency, OM_m is the microalgae organic matter (0.87 for *Tisochrysis lutea* and 0.6 for *Chaetoceros gracilis*) and OM_w is the waste organic matter (biodeposits).

Energy budget

Ecophysiology data were converted into energy values to define the scope for growth (SFG) for each oyster: SFG = (IR × AE) − OC, where IR is the ingestion rate, AE is the assimilation efficiency, and OC is the oxygen consumption. We used 20.3 J for 1 mg of particulate organic matter and 14.1 J for 1 mg O_2 (Bayne and Newell, 1983; Gnaiger, 1983; Bayne *et al.*, 1987).

Shell growth rate

To investigate shell growth, the shells were sawn with a 'Swap Top' Trim Saw machine (Inland, Middlesex, UK), which included a diamond Trim Saw Blade (Thin Cut) IC-40961. Shell edges were then polished for 5 s with various grades of water sandpaper sheets. The shell sections were examined under a Leitz Dialux 22 compound fluorescence microscope equipped with an I3-filter block and an optical micrometer. Shell growth was measured by evaluating the thickness of deposits at the ventral side of the shell, from the surface to the calcein marks, with an optical micrometer (Linard *et al.*, 2011). Shell deposit rate (SDR) was calculated by dividing the thickness of deposits by the time which had elapsed since the marking. SDR is expressed in µm d^{-1} (Linard *et al.*, 2011; Joubert *et al.*, 2014).

Measurement of the reproductive effort

After flesh dissection, the visceral mass (VM) was drained on absorbent paper, weighed and put in 10% formalin seawater for 72 h before being transferred into 70% ethanol. VM were cut along the sagittal plane and digital images (600 dpi) were obtained using a desktop scanner. The digital pictures were then analysed using ImageJ software (v. 1.6.0). Gonad size was characterized using a gonad development index (GDI) which is equal to the ratio of the gonad

surface (G) to the VM area of a sagittal section: GDI = G/VM (Fournier *et al.*, 2012; Le Moullac *et al.*, 2013).

Gametogenesis analysis by histology

For histological analysis, the fixed gonads were dehydrated through a graded series of ethanol, embedded in paraffin, sectioned into 3 µm slices on a rotary microtome, stained using haematoxylin and eosin and finally mounted on glass microscope slides. Gametogenesis condition was evaluated through the identification of regression signs (*i.e.* epithelial detachment, advanced regression stage). The presence or absence of regression signs was assessed for each individual.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Normality of data distribution and homogeneity of variance were tested with the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. Means of IR, OC, AE, SFG and GDI were compared using one-way ANOVA for each treatment ($\alpha = 0.05$). Data expressed in proportion (AE and GDI) were previously transformed by the arcsine square root function. Tukey's post hoc test was used to determine the significant differences between the averages of each group. Since the assumptions of normality and homogeneity of variance were not met for SDR data, we used the non-parametric Kruskall-Wallis test to compare means of each treatment. Fisher's exact test was used to analyse gametogenesis condition (*i.e.* presence or absence of regression signs). For this test, individuals at T0 were first compared to those placed under control condition (T0 *vs* control), in order to rule out potential laboratory or time effect on the gametogenesis condition, and be able to pool T0 and control conditions to increase the power of the statistical test. This “new control” group could thus be compared to the pooled individuals exposed to micro-PS, as to perform T0/control *vs* micro-PS comparison. Results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Metabolic rates: ingestion and respiration

Fluorescence measurements revealed an average ingestion rate of $20.7 \pm 5.4 \times 10^7$ cells h^{-1} g^{-1} dry weight (dw) under control conditions; $18.7 \pm 7.7 \times 10^7$ cells h^{-1} g^{-1} dw at 0.25 µg micro-PS L^{-1}; $20.9 \pm 3.2 \times 10^7$ cells h^{-1} g^{-1} dw at 2.5 µg L^{-1} and $20.3 \pm 4.5 \times 10^7$ cells h^{-1} g^{-1} dw at 25 µg L^{-1}. The one-way ANOVA revealed no significant difference between conditions ($F_{3, 32} = 0.279$, $p = 0.840$) (**Figure 2**a).

The average of oxygen consumption was of 1.34 ± 0.37 mg O_2 h^{-1} g^{-1} dw under control conditions; 1.47 ± 0.37 mg O_2 h^{-1} g^{-1} dw at 0.25 µg L^{-1}; 1.45 ± 0.20 mg O_2 h^{-1} g^{-1} dw at 2.5 µg L^{-1} and 1.40 ± 0.19 mg O_2 h^{-1} g^{-1} dw at 25 µg L^{-1}. The one-way ANOVA revealed no significant difference between conditions ($F_{3, 32}$ = 0.216, p = 0.885) (**Figure 2**b).

Digestion: assimilation efficiency

The counts carried out on polycarbonate filter allowed to estimate the weight of micro-PS in the dry weight of biodeposits. This estimate amounts to approximately 2.8 × 10^{-3} µg micro-PS $µg^{-1}$ dw at 0.25 µg L^{-1}; 4.3 × 10^{-3} µg micro-PS $µg^{-1}$ dw at 2.5 µg L^{-1} and 28.0 × 10^{-3} µg micro-PS $µg^{-1}$ dw at 25 µg L^{-1}. The corrected OM measurements obtained in oysters placed under control conditions were 73.6 ± 7.4% OM biodeposits (OM_w) for 82.4% OM microalgae (OM_m). For oysters exposed to 0.25; 2.5 and 25 µg micro-PS L^{-1}, OM measurements were respectively 69.0 ± 8.5% OM_w for 75.1% OM_m; 79.8 ± 3.4% OM_w for 81.9% OM_m and 78.3 ± 6.6% OM_w for 75.9% OM_m.

The assimilation data obtained from the OM data were used to obtain for each oyster an average assimilation efficiency of 48.9 ± 18.4% for individuals placed under control conditions; 30.1 ± 24.7% at 0.25 µg micro-PS L^{-1}; 20.4 ± 6.7% at 2.5 µg L^{-1} and 3.0 ± 13.4% at 25 µg L^{-1}. The one-way ANOVA revealed a significant difference between conditions ($F_{3, 13}$ = 5.576, p = 0.011). The Tukey post-hoc test revealed a significant difference between the control condition and the 25 µg L^{-1} treatment (mean diff. 45.8%, p = 0.009) (**Figure 2**c).

Standardized scope for growth

Analysis of metabolic rates and assimilation efficiency indicated a mean energy balance (SFG) decreasing from the control condition to the micro-PS treatments at 0.25 and 2.5 µg L^{-1} (control, 88.1 ± 23.1 J h^{-1} g^{-1} dw; 0.25 µg L^{-1}, 39.7 ± 19.9 J h^{-1} g^{-1} dw; 2.5 µg L^{-1}, 24.8 ± 5.6 J h^{-1} g^{-1} dw) and becoming negative at 25 µg L^{-1} (-13.2 ± 2.5 J h^{-1} g^{-1} dw). The one-way ANOVA revealed a significant difference between conditions ($F_{3, 32}$ = 62.47, p < 0.0001). The Tukey post-hoc test showed a significant difference (p < 0.0001) between the means of the control condition and the 3 treatments at 0.25; 2.5 and 25 µg L^{-1}. A significant difference was also observed between the mean of treatments at 0.25 and 25 µg L^{-1} (mean diff. 52.8 J h^{-1} g^{-1} dw, p < 0.0001) and those of treatments at 2.5 and 25 µg L^{-1} (mean diff. 37.9 J h^{-1} g^{-1} dw, p = 0.0004) (**Figure 3**).

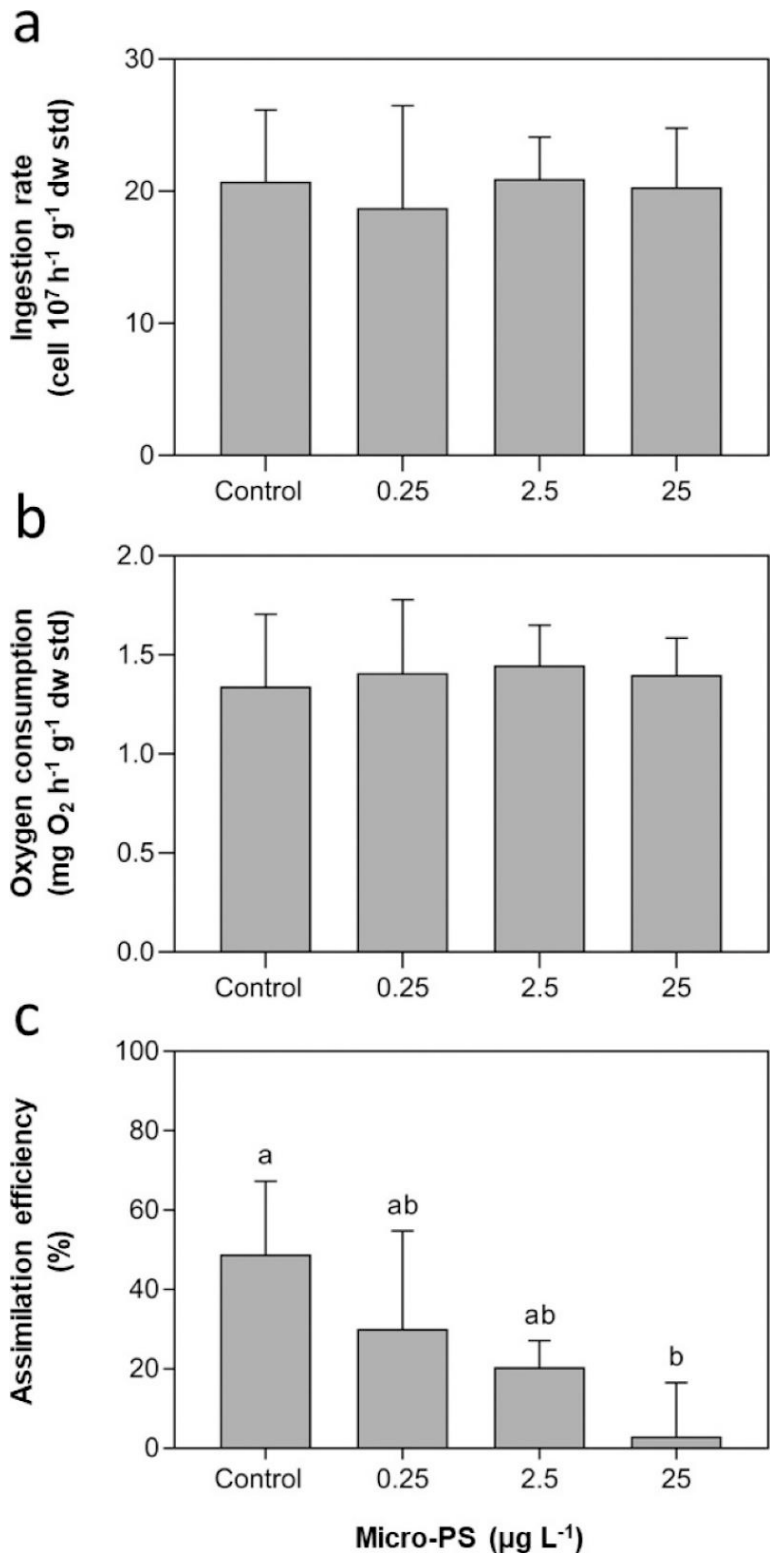


Figure 2. Effect of microplastics on bioenergetic parameters of *P. margaritifera*. Impact of micro-PS on: ingestion rate (**a**), oxygen consumption (**b**) and assimilation efficiency (**c**). Mean ± standard deviation ($8 \leq n \leq 12$).

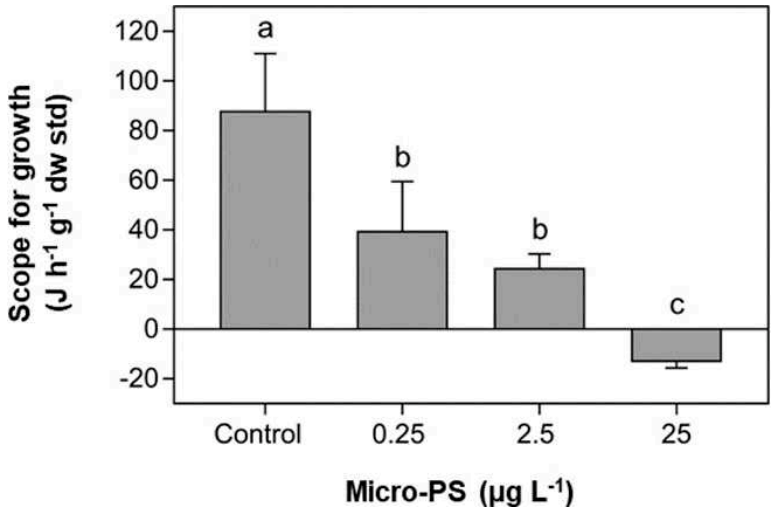


Figure 3. Energy balance of oysters exposed to micro-PS. Mean ± standard deviation (8 ≤ n ≤ 12).

Shell growth

Shell deposition rate (SDR) measurement was obtained through calcein marking in order to analyse the effect of a 2-month micro-PS exposure at different doses on shell growth. The Kruskall-Wallis test showed no significant effect of micro-PS on SDR (p = 0.252) (**Figure S2**, SI).

Reproductive effort and gametogenesis

Means of gonad development index (GDI) measured in individuals at T0 (before micro-PS exposure) and those placed under control conditions were respectively of 9.2 ± 3.2% and 7.2 ± 7.3%. For individuals treated with 0.25; 2.5 and 25 µg micro-PS L^{-1}, means of GDI were respectively of 7.6 ± 8.2%, 8.3 ± 5.1% and 8.0 ± 6.4% (**Figure S3**, SI). One-way ANOVA revealed no significant differences between conditions ($F_{4, 45}$ = 0.156, p = 0.959).

Gonads observations revealed that 100% of samples were male, which can be expected for pearl oysters at this age. Histological analysis identified "normal" gametogenesis with the presence of gonadal tubules containing germ cells ranging from spermatogonia (localized in the periphery of tubules) to spermatids and spermatozoa (more central) (**Figure 4**a-b). Gametogenesis was also marked by a high proliferation activity in the epithelium of gonadal tubules. Small "holes" in gonadal tubules were also observed in some individuals exposed to 0.25 and 2.5 µg L^{-1} (**Figure 4**c) but not seen in the T0, control and 25 µg L^{-1} samples. Larger magnification analysis revealed the presence of large cells within or near to these breakthroughs (**Figure 4**d). These cells were composed of an eccentric nucleus (**Figure 4**e) and a cytoplasm that sometimes contains many granules. These cells could be assimilated to haemocytes.

Epithelial detachments were also observed in gonadal tubules of individuals exposed to 25 µg L^{-1}, with little or no proliferation activity (**Figure 4**f). Indeed, the remaining germ cells were essentially spermatids that were centred within tubules. Although advanced regression stages were observed in oysters for every micro-PS doses, they were especially visible at 25 µg L^{-1}. This stage leads to haemocytes infiltrations in gonadal tubules completely or partially emptied of their germ cells whose degradation products appear in pink (**Figure 4**g).

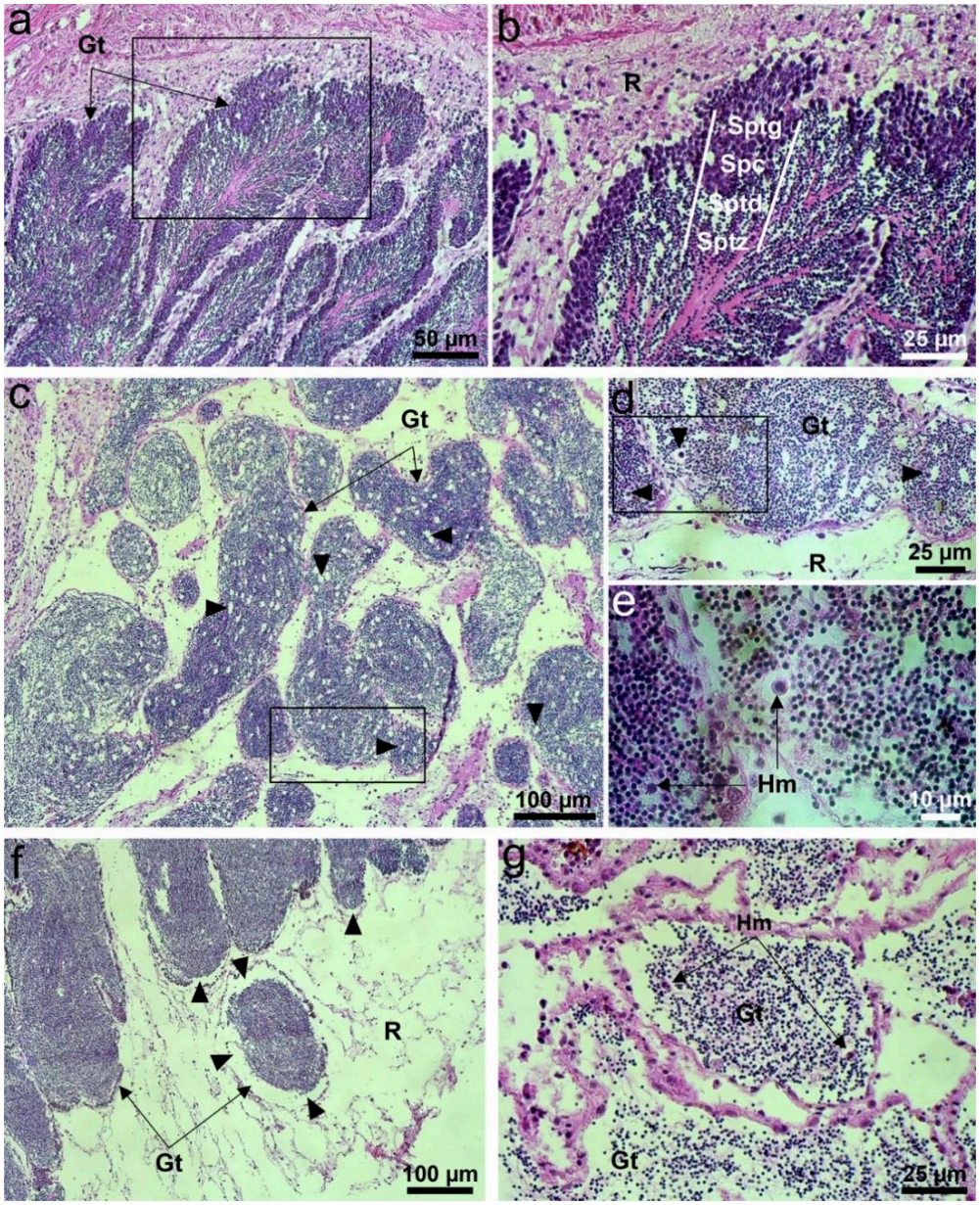


Figure 4. Histology panels from the gonads analysis of oysters exposed to micro-PS. (**a**, **b**) Intermediate stage gametogenesis in a control sample. (**c**, **d**, **e**) Gametogenesis at an intermediate stage in a sample exposed to 2.5 µg L^{-1}. (**f**) Gametogenesis at an intermediate stage in a sample exposed to 25 µg L^{-1}. (**g**) Regression of gametogenesis in a sample exposed to 25 µg L^{-1}. Hm: hemocytes. Sptg: Spermatogonia. Sptc: Spermatocytes. Sptd: Spermatids. Sptz: Spermatozoa. Gt: Gonadal tubules. R: Reserve tissues. Arrowhead: Regression areas. Panels b and d are expanded images from panels a and c, respectively, and panel e is expanded image from panel d.

The exact Fisher test performed on the presence or absence of regression signs revealed no significant difference between T0 and the control condition (p = 0.211). However, a significant higher proportion of pearl oysters exposed to micro-PS showed signs of regression of gametogenesis (63%, p = 0.0012) when compared to unexposed individuals (T0 and control condition, 15%).

Discussion

The aim of this study was to investigate the impact of micro-PS on the physiology of *P. margaritifera* by evaluating the effects of different exposition levels micro-PS on the energy balance and reproduction. We found that there was a significant dose-dependent negative response of oysters exposed to micro-PS, with unpredictable detrimental consequences for the sustainability of pearl oyster populations, even at low concentrations of micro-PS (*i.e.* 0.25 µg L^{-1}).

Energy budget is the amount of energy expended for an individual's maintenance (*i.e.* general metabolism, somatic tissue growth, and gametes production). The scope for growth (SFG) defines the surplus of energy available for growth beyond that required for maintenance, and can thus be seen as a measure of an individual's potential to thrive in its environment. The metabolic responses of a stressed organism can result in an increase in energy costs of an individual's maintenance, which, if it is not compensated by an equivalent increase in energy intake, forces the organism to sacrifice some of the energy normally allocated to functions such as growth and/or reproduction to mitigate this increase in energy cost. Hence, a SFG of zero would reflect a cessation of growth for an individual, while a negative SFG would indicate that the metabolic costs associated with the individual's maintenance (respiration, metabolism and reproduction) outweigh the energy absorbed by food ingestion, endangering the survival of the individual. In our study, pearl oysters ingesting plastics had a significant dose-dependent decrease in SFG, observed from doses of 0.25 µg L^{-1} onward. However, the shell deposit rate (*i.e.* actual physical growth) was not significant different among conditions after 2-months exposure, and was thus somehow maintained, despite the decrease in SFG. In addition, SFG became negative at the dose of 25 µg L^{-1}. These results indicate that exposed oysters had to draw their energy from reserves, or had to gain it from another biological compartment (not growth).

Ingestion rate and assimilation efficiency are considered to be the main processes responsible for energy gain in bivalves (Hawkins *et al.*, 1999) and the physiological parameters that most influence SFG (Albentosa *et al.*, 2012). Ingestion rate of microalgae by *P. margaritifera* was not affected by the presence of micro-PS at the tested doses. These results are in agreement with those obtained for the flat oyster *Ostrea edulis*, whose filtration remained unchanged after mesocosm exposure to PLA (polylactic acid) and HDPE (high density polyethylene) MP type at

low (0.8 µg L^{-1}) and high (80 µg L^{-1}) concentrations (Green, 2016). However, these ingestion results are apparently in contradiction with those obtained in *C. gigas*, which showed an increase in microalgal consumption in individuals exposed to micro-PS (23 µg L^{-1}) (Sussarellu *et al.*, 2016). This divergence may be related to individual measurements carried out in our study and population measurements in the case of work on *C. gigas*. It is also suggested that micro-PS exposure could induce a compensatory effect on food intake in the Pacific oyster (Sussarellu *et al.*, 2016). In the crab *C. maenas*, a decrease in the energy allocated to the animal's growth has been shown after 4-weeks exposure to PP fibers (polypropylene, 1-5 mm) (Watts *et al.*, 2015). In this study, the most important factor influencing SFG was ingestion rate, which resulted in a clear decrease of 90% (Watts *et al.*, 2015).

Although ingestion rate measurements did not demonstrate any alteration due to micro-PS exposure, assimilation measurements revealed a dose-dependent decrease in AE in exposed oysters. This means that for an equal volume of water filtered by the oysters, the assimilation of microalgae was disrupted by the presence of micro-PS, and the energy provided by food intake was lower for exposed oysters. This inhibitory effect of micro-PS on food assimilation could occur either directly, through interference with the assimilation processes within the digestive system, or indirectly, through competition with microalgae present in the acclimation medium. The impact of micro-PS on assimilation efficiency has also been reported in other studies: the reduction in body weight and assimilation efficiency for the deposit-feeder *Arenicola marina* was correlated with a reduction in the sediment organic matter content due to the presence of plastics (Besseling *et al.*, 2013). Wright *et al.* (2013a) found that inflammatory responses associated to MP, combined with a reduction in feeding activity and a longer residence time in the intestine, could be responsible of an energy reserves depletion in *A. Marina* (Wright *et al.*, 2013a); also, the presence of polyamide (PA) fibers in the digestive tract of the amphipod *G. fossarum* was shown to inhibit assimilation efficiency (Blarer and Burkhardt-Holm, 2016). However, in contrast to *P. margaritifera*, an increase in absorption efficiency was observed and an enhancement of mechanical digestion was suggested in *C. gigas* after micro-PS exposure (Sussarellu *et al.*, 2016).

With assimilation efficiency decreasing in correlation with micro-PS concentrations, and an ingestion rate being similar for all concentrations, the metabolic rate (indirectly measured by respiration through oxygen consumption) could have been reduced in order to compensate for the energy deficit observed with the SFG. However, our results indicate that respiration, and thus metabolic rate, were not impacted by micro-PS. Therefore, the only possibility for exposed oysters to compensate the decrease in energy balance seems to be to feed-back on reproduction, by altering reproductive effort and/or gametogenesis.

Gametogenesis in bivalves represents a particularly high energy demand period. In *P. margaritifera*, reproduction is continuous. This "opportunistic strategy" consists in investing any excess energy into the gametes production (Stephane Pouvreau *et al.*, 2000). The reproductive effort measured by the GDI allows for the evaluation of the amount of energy allocated specifically to reproduction. The method used in this work was previously validated in the pearl oyster and is suited to study the relationship between the trophic level and the reproductive effort (Le Moullac *et al.*, 2013). Our results showed that micro-PS did not influence the development of gonadal tissue, and thus had no effect on the reproductive effort of *P. margaritifera*. In all conditions, GDI measurements were particularly low in our experiment (between 7.2 and 8.3%) compared to the data found in the literature (15 to 18% and 18 to 34%) (Fournier *et al.*, 2012; Le Moullac *et al.*, 2013). This difference may be explained by the age of oysters used here (*i.e.* 1-1.5 year old), for whom the reproductive effort is 5 times lower than individuals aged of 3 to 4 years (Stephane Pouvreau *et al.*, 2000). Nonetheless, despite having a similar reproductive effort, exposed oysters' gametogenesis was strongly impacted by the presence of micro-PS. Abnormal phenomena were observed with increasing concentrations of micro-PS and could be referred to as regression induced by energy deficiency. The presence of "small holes" in the gonadal tubules seems to be the premises of a regression phase. The presence of haemocytes within these breakthroughs supports this hypothesis. This could be areas where phagocytosis of germ cells is initiated. It is conceivable that these phenomena of gonadal resorption encountered in exposed oysters to micro-PS are linked to the metabolites production. These observations were made in several exposed individuals, and corroborate the bioenergy results. Indeed, a negative energy balance indicates that the animal must draw from its reserves to satisfy its metabolism and provide its maintenance, to the detriment of its growth and reproduction. In *P. margaritifera*, the excess of energy being directly intended for the gametes production, it is the gonads that also constitute the reserves (while we demonstrated that growth was not impacted). Once the gonads are exhausted, and if adverse environmental conditions persist, the animal's energy impairment is likely to become lethal. These results agreed with those derived from the DEB (Dynamic Energy Budget) analysis by Sussarellu *et al.* (2016) in *C. gigas*, suggesting that the energy fraction allocated to reproduction seemed to shift toward structural growth and high maintenance costs following exposure to micro-PS. Transcriptome approaches have also revealed a decrease in the transcripts regulation coding for proteins involved in the insulin pathway (Sussarellu *et al.*, 2016). Hence, micro-PS exposure may affect gene regulation in response to insulin signalling which is responsible for germ cell proliferation, differentiation and maturation (Gricourt *et al.*, 2006). This hypothesis would explain the interruption of germ cell proliferation in the gonadal tubules of exposed pearl oysters which result in epithelial detachments. This phenomenon was also reported in the pearl oyster conditioned in a medium weakly enriched in microalgae (1.5 cells μL^{-1}) (Le Moullac *et al.*, 2013). That provide a second explanation to the divergence in food

behaviour between *C. gigas* and *P. margaritifera* which could be related to the energetic support to gametogenesis, partly based on glycogen reserves in *C. gigas* (Jouaux *et al.*, 2013), and completely dependent on food for *P. margaritifera*; the gonadic tissue serving as energy buffer explaining resorption figures observed in histology. In any case, these results provide further knowledge about the impact of MP on marine bivalves. At a different reproduction level, the impact of micro-PS on the gametogenesis of *P. margaritifera* complements results on gametes quality/quantity and larval development in *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2016), with upstream new data.

Note that virgin micro-PS used in this study contain a slight anionic charge from sulfate ester and are cross-linked with divinylbenzene (DVB). These non-functionalized microbeads are packaged in an aqueous suspension with minimal surfactant in the final preparation. Thus, we cannot distinguish between the possible mechanisms explaining the toxicity of micro-PS, to which direct particle toxicity and effects of micro-PS associated-chemicals such as DVB, may contribute. Although we cannot establish an impact of these chemicals in our experiment, background effects should be considered (Karami, 2017).

In conclusion, this study highlights the impact of ingesting a diet containing polystyrene microbeads on the assimilation efficiency of the pearl oyster which directly influences its energy balance. The dose-dependent decrease in AE and SFG supports these results and demonstrates an immutable effect of micro-PS on the oyster physiology. Given the bioenergy results and the strategy reserves management of *P. margaritifera*, the decrease in energy gain, which in some cases (*i.e.* 25 µg L^{-1}) results in an energy deficit, is reflected on its reproduction. Gonads appear to provide the missing energy to maintain animals' metabolism through the production of metabolites derived from germ cells phagocytosis. The pearl oyster exposed to micro-PS during a 2-month period thus maintains its metabolism and its vital functions at the expense of its reproduction, and thus of its future population sustainability. Taken together, our study and future work on the topic should promote decision-making on plastic waste management measures in Polynesian lagoons, especially in atolls that have 30 to 40 years of pearl farming history without waste regulations nor clean up. Our work aims to provide information to local authorities in order to regulate the flow of pearl farm equipments in direction to pearl farming atolls and implement a waste management policy such as collection and recycling of these equipments.

Supporting information

The SI contains supplementary figures about the polymer type confirmation of micro-PS 6 and 10 µm by Raman micro-spectroscopy analysis (**Figure S1**); the effect of micro-PS on the SDR (**Figure S2**) and the GDI (**Figure S3**) of *P. margaritifera*.

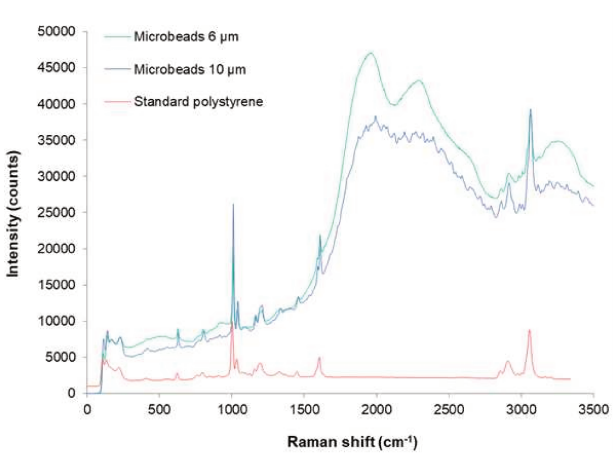


Figure S1. Polymer type confirmation by Raman micro-spectroscopy analysis of polystyrene microbeads 6 and 10 µm. The peaks between 1800 and 2800 cm^{-1} for the micro-PS (6 and 10 µm) spectra could be related to the presence of surfactant and/or Milli-Q water in the aqueous suspension. Standard polystyrene is an additive-free reference polymer supplied by GoodFellow Cambridge Ltd (Lille, France).

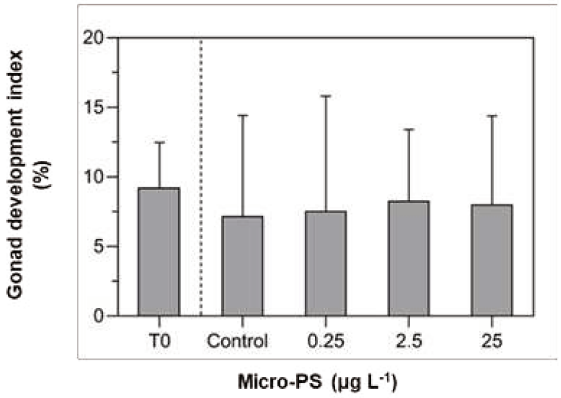


Figure S2. Effect of micro-PS on the shell deposition rate (SDR) of *P. margaritifera*. Mean ± standard deviation (n=10).

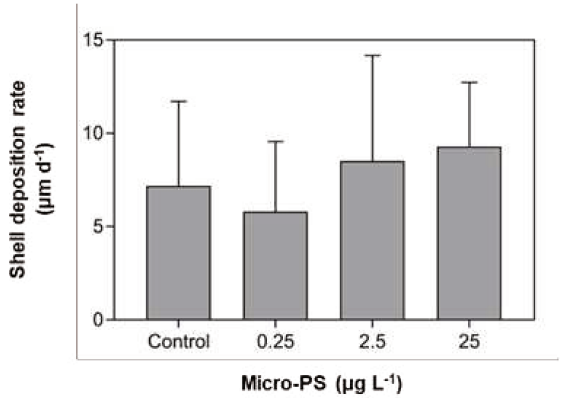


Figure S3. Gonad development index (GDI) of *P. margaritifera*. Dotted line: separation of calculated GDI in samples before (T0) and after (control, 0.25, 2.5, 25 µg L^{-1}) the micro-PS exposure. Mean ± standard deviation (n=10).

3. Article 3 (publié) – *Environmental Pollution*

Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon [a, †], Lucie Morvan [a, †], Arnaud Huvet [b], Virgile Quillien [a, b], Claude Soyez [a], Gilles Le Moullac [a], Jérémy Le Luyer [a, *]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

[†] The first two authors contributed equally

[*] *Corresponding author*

Highlights

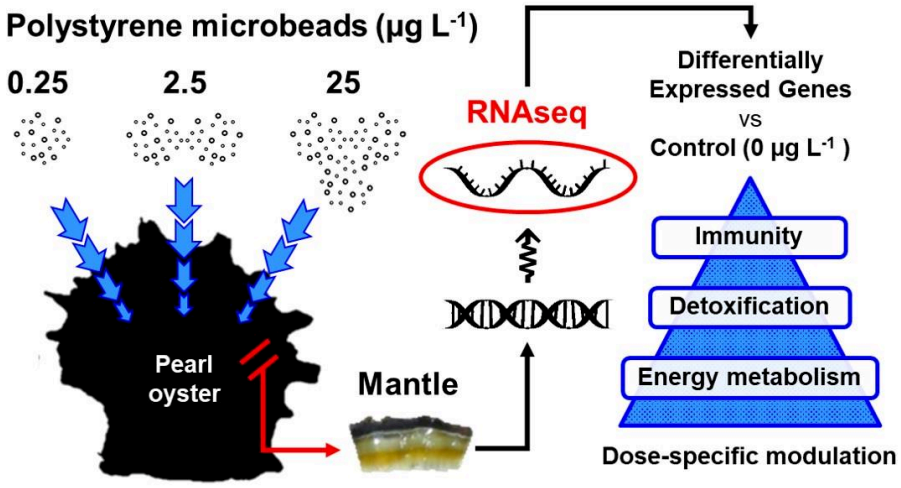
- Antioxidant and detoxification processes are impacted by long-term polystyrene microbeads exposure in *P. margaritifera*.
- Energy metabolism and immunity are dose specific response to micro-PS exposure.
- Bioenergetics and transcriptomics refine the energy-limited tolerance to stress concept for emerging pollutants.

Abstract

A combined approach integrating bioenergetics and major biological activities is essential to properly understand the impact of microplastics (MP) on marine organisms. Following experimental exposure of polystyrene microbeads (micro-PS of 6 and 10 µm) at 0.25, 2.5, and 25 µg L^{-1}, which demonstrated a dose-dependent decrease of energy balance in the pearl oyster *Pinctada margaritifera,* a transcriptomic study was conducted on mantle tissue. Transcriptomic data helped us to decipher the molecular mechanisms involved in *P. margaritifera* responses to micro-PS and search more broadly for effects on energetically expensive maintenance functions. Genes related to the detoxification process were impacted by long-term micro-PS exposure through a decrease in antioxidant response functioning, most likely leading to oxidative stress and damage, especially at higher micro-PS doses. The immune response was also found to be dose-specific, with a stress-related activity stimulated by the lowest dose present after a 2-month

exposure period. This stress response was not observed following exposure to higher doses, reflecting an energy-limited capacity of pearl oysters to cope with prolonged stress and a dramatic shift to adjust to pessimum conditions, mostly limited and hampered by a lowered energetic budget. This preliminary experiment lays the foundation for exploring pathways and gene expression in *P. margaritifera*, and marine mollusks in general, under MP exposure. We also propose a conceptual framework to properly assess realistic MP effects on organisms and population resilience in future investigations.

Graphical abstract



Keywords

Microbeads | Marine bivalve | Differentially expressed genes | Stress response | Energy-limited tolerance

Introduction

Plastics represent the greatest proportion of marine litter (up to 60-80 % of all marine debris) and quantities of marine plastic continue to increase due to both terrestrial sources and maritime activities (Jambeck *et al.*, 2015). Over the last decade, plastic debris, and more specifically "microplastics" (MP, defined as plastic particles < 5 mm) have emerged as a global issue (GESAMP, 2015), leading to increased concerns about their ecological impacts (Rochman *et al.*, 2016). Indeed, owing to their ubiquitous nature and small size, the bioavailability of MP makes them easily ingestible by a wide range of organisms regardless of trophic position (Farrell and Nelson, 2013; Setälä *et al.*, 2014). In filter-feeders, MP ingestion has been recorded *in situ* (Murray and Cowie, 2011; Mohsen *et al.*, 2019), but has also been largely documented in controlled environment experiments conducted on species such as bivalves (Browne *et al.*, 2008;

Avio *et al.*, 2015; Sussarellu *et al.*, 2016; Gardon *et al.*, 2018), zooplankton (Lee *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2013, 2015; Jeong *et al.*, 2016), lugworms (Besseling *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013a; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015), or sea cucumbers (Graham and Thompson, 2009; Mohsen *et al.*, 2019). Experimental consumption of MP, mostly microbeads, can result in adverse health impacts (Franzellitti *et al.*, 2019), including physical harm (Wright *et al.*, 2013b), and physiological effects on feeding activity (Wright *et al.*, 2013b; Cole *et al.*, 2013, 2015), oxygen consumption (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Watts *et al.*, 2016; Rist *et al.*, 2016), and assimilation efficiency, with consequences for energy balance (Blarer and Burkhardt-Holm, 2016; Gardon *et al.*, 2018), fecundity (Besseling *et al.*, 2014; Cole *et al.*, 2015; Sussarellu *et al.*, 2016), growth (Besseling *et al.*, 2014; Watts *et al.*, 2015), and survival (Rist *et al.*, 2016). At the cellular level, evidence of stress has been detected through an increase in reactive oxygen species (ROS) production in mussel haemocytes (Paul-Pont *et al.*, 2016). At the molecular level, ingested MP affect several pathways involved in stress and immune response in coral (Tang *et al.*, 2018), specifically the antioxidant system, lysosomal compartment, and peroxisomal proliferation (Avio *et al.*, 2015), as well as apoptotic processes in mussel (Détrée and Gallardo-Escárate, 2018). At early developmental stages, exposure to polyethylene microbeads affects the nervous system and metabolic genes in zebrafish (LeMoine *et al.*, 2018), and shell biogenesis, immunomodulation, and lysosomal enzymes in mussel (Capolupo *et al.*, 2018).

Individual physiological and metabolic responses to cope with stressful conditions have a high energetic cost that would be difficult to maintain in the long term (Guderley and Pörtner, 2010). Conceptually, the capacity to respond to a stress is intimately linked to the energy allocated for such maintenance of normal functioning in stressful conditions (Nevo, 2011); hence, the interpretation of snapshots of biomarker variations are only valid in the light of the bioenergetic budget (Hõrak and Cohen, 2010). This idea is a focal point of energy-limited tolerance to stress (Sokolova, 2013). Interestingly, this concept should be transferable to experiments on the impact of stressors that are novel in some way and/or multiple stressors. Marine organisms have evolved numerous strategies to cope with environmental fluctuations such as temperature, salinity, hypoxia, and dessication (Hochachka and Somero, 2002), but less is known about their capacities of adaptation and acclimation to emerging pollutants. To date, several biomarkers have been commonly used to assess detoxification (*e.g.* glutathione-S-transferase [GST], super oxide dismutase [SOD], catalase [CAT]), stress (HSP), and immune (toll-like receptors [TLR]) responses during exposure to pollutants such as MP (Isaksson, 2010; Paul-Pont *et al.*, 2016; Détrée and Gallardo-Escárate, 2018). Nevertheless, contrasting observations across experiments are often reported for these biomarkers (for instance). Thus, an integrative approach, based on the concept of energy-limited tolerance to stress (Sokolova, 2013) and combining biomarkers and bioenergetics monitoring, would prove useful for understanding these variations and ultimately choosing an optimal framework for future experiments.

In French Polynesia, the pearl oyster is an economical interest species of which aquaculture (pearl-farming) is the second most important source of income through the trade of pearl and mother-of-pearl. Such as other filter-feeding organisms, it is also a species of ecological interest serving as a biological model for lagoon ecosystems and environmental survey (Bernagout *et al.*, 2014). Pearl farming still relies almost exclusively on collection of wild spat; hence any biotic or abiotic changes on lagoons ecosytems might have dramatic effect on the sustainability of the activity. In order to grasp this ermerging risk, we investigated here the molecular-level impacts of polystyrene microbeads (micro-PS) on the pearl oyster, taking advantage of a previous ecophysiological study that showed a dose-dependent energy decrease for individuals exposed to increased micro-PS concentration (Gardon *et al.*, 2018). This molecular approach was conducted without a-priori effort to detect non-visible sublethal effects at the macroscopic level by exhaustive screening of gene expression or targeting potential biomarkers in response to micro-PS exposure. We used a genome-wide transcriptomic approach on the mantle tissue, a key organ in bivalves because it is the first sensor of the environment and responsible for the biomineralization functions of shell and pearl formation in *P. margaritifera* (Joubert *et al.*, 2010). We hypothesized that micro-PS exposure could have led to (1) a modulation of the expression of genes involved in energy metabolism and (2) biomineralization functions, based on the energy deficiency observed at macroscopic level, and (3) an energy-dependent stress and immune response linked to exposition levels and a putative higher bacterial load associated with micro-PS. Thus, this transcriptomic approach was coupled with an additional metabarcoding experiment to trace possible rapid changes of microbiota communities associated with micro-PS. As a result of this study, potential biomarkers could ultimately be applied in future ecophysiological experiments testing relevant conditions with realistic MP levels encountered in lagoons of French Polynesia that had not yet been measured.

Material and methods

Experimental design

We used a random subset of mantle tissue samples collected as described in a study already published (Gardon *et al.*, 2018). This earlier experiment made a two-month exposition of pearl oyster individuals to polystyrene microbeads (micro-PS of 6 and 10 µm). Briefly, adult pearl oysters were collected in a pearl farm located in Arutua atoll (French Polynesia) in October 2016 and transferred to Vairao lagoon (Ifremer marine concession, Tahiti, French Polynesia). These individuals were 1−1.5 years old with a mean height of 5.9 ± 0.41 cm and mean weight of 25.2 ± 4.9 g. They were conditioned in four experimental 20-L tanks per treatment (six oysters per tank, that is, 24 oysters per treatment) with a seawater supply filtered mechanically at 25 and 5 µm.

After two weeks acclimation, the pearl oysters were exposed to micro-PS over a two-month period at 0.25, 2.5, and 25 µg L^{-1} (3.2×10^2, $\times10^3$, $\times10^4$ particles L^{-1}, respectively) and compared with a control (0 µg L^{-1}). The maximum dose tested (25 µg L^{-1}) corresponded to a mass concentration in the range of the highest estimated field concentration of particles > 333 µm, from manta trawl sampling in the north western Mediterranean Sea (*i.e.* 23 µg L^{-1}; Collignon *et al.*, 2012). This concentration was selected to serve as a benchmark for comparison with published exposures of Pacific oyster (Sussarellu *et al.*, 2016), and was decreased twice, creating two lower treatments (2.5 and 0.25 µg L^{-1}), to target a response window with a dose-effect relationship. Meanwhile, although we know that the size range of particle retention in this species is between 2 to 200 µm (Pouvreau *et al.*, 1999), quantitative data on the smallest environmental MPs is not yet available for the estuaries and lagoons where it grows. The use of dose–response experiments can therefore be useful in assessing toxicity thresholds for a given contaminant and organism (Paul-Pont *et al.*, 2018) until such data becomes available, allowing greater environmental realism in subsequent work. For the present experiment, we used unlabeled micro-PS with diameters of 6 and 10 µm, purchased from Polyscience (Polybead, Washington, PA, U.S.) and packaged in aqueous solution (Milli-Q water) at a concentration of 2.10×10^8 (2.5% w/v, 5 ml) and 4.55×10^7 (2.5% w/v, 5 ml) particles ml^{-1}, respectively. Micro-PS were mixed in 50-L reservoirs at equal weight (micro-PS ratio 6/10 µm = 4.615) with two microalgae (*Tisochrysis lutea* and *Chaetoceros gracilis*) at a daily ratio equal to 7-8 % dry weight algae/dry weight oyster (*i.e.* about 35-40 cells $µl^{-1}$ in the water surrounding the oysters). Micro-PS sizes (6 and 10 µm) were in the optimum retention range of pearl oysters (*i.e.* 5 µm; Pouvreau *et al.*, 1999), and chosen to be as close as possible to the size of the microalgae (*i.e.* 4 to 8 µm). The microalgae/micro-PS mixtures were injected continuously into the experimental rearing tanks and renewed every 24 hours in the reservoirs. Additional information on the experimental design and the in vivo exposure are available in Gardon *et al.* (2018).

In addition, we recreated a second experiment with similar algae/micro-PS mixtures to those used in Gardon *et al.* (2018), following identical doses and protocols, to assess bacterial colonization and dynamics over a 24-h period. This period corresponded to the maximum incubation time of mixtures prior their addition in the pearl oyster rearing media. Bacterial load and communities in tank systems were assessed by quantitative PCR. It should be noted that similar PS microbeads of 2 µm were previously reported to have no effects on microalgal status (Long *et al.*, 2017). Bacterial community assessment was conducted with metabarcoding of 16S rRNA (Supplementary Information).

Sampling, extraction, and sequencing

At the end of the two-month exposure period, a piece of mantle from each of 40 individuals (10 individuals per treatment) was placed in RNA later solution and stored at –80°C. Total RNA were extracted with TRIZOL Reagent (Life Technologies, USA), at a ratio of 1 ml per 100 mg tissues, following manufacturer's recommendations. We validated RNA quantity, integrity, and purity with a Nanodrop (NanoDrop Technologies Inc., USA) and a 2100 BioAnalyzer System (Agilent Technologies, USA). RNA was dried in RNA-stable solution (ThermoFisher Scientific, USA), following manufacturer's recommendations, and shipped at ambient temperature to McGill sequencing platform services (Montreal, Canada). At this step, one individual from the 25 µg L^{-1} treatment was excluded because its total RNA did not meet the quality threshold (*i.e.* only 9 individuals remained for this treatment). TruSeq RNA libraries were randomly multiplexed (n = 20-19 individuals per lane) and 100-bp paired-end (PE) sequenced on a HiSeq 4000 at the McGill Genome Quebec platform (Montreal, CA).

Transcriptomic data analysis

We first filtered raw reads with Trimmomatic v0.38 for a minimum length (60 bp) (Bolger *et al.*, 2014), minimum quality (leading: 20; trailing: 20), and for the presence of putative contaminant and remaining adaptors (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/). Read quality was assessed before and after trimming with FastQC v0.11.8 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) and MultiQC v1.6 (Ewels *et al.*, 2016). Only high-quality PE reads were retained and mapped against the reference genome (Le Luyer *et al.*, 2019) using GSNAP v2018.07.04 (T. D. Wu *et al.*, 2016) with default parameters, but allowing a minimum mismatch value of 2 and a minimum read coverage of 90 %. We used only properly paired and uniquely mapped reads for the downstream analysis (T. D. Wu *et al.*, 2016). The count of differentially expressed genes (DEGs) was conducted with HTSEQ v0.11.2 (Anders *et al.*, 2015). The *DESeq2* v1.22.2 R package (Love *et al.*, 2014) was used to examine differential expression between micro-PS treatments and the control using a series of pairwise contrasts and Wald's tests. Genes were considered differentially expressed when absolute value of Log2Fold Change ($|Log2FC|$) > 2 and False Discovery Rate (FDR) < 0.01. Visualization of DEGs was conducted using an UpSet plot created with the *UpSet and Pheatmap* R package (Kolde and Kolde, 2015). For functional annotation, we tested for gene ontology (GO) enrichment using GOA-tools v0.7.11 (Klopfenstein *et al.*, 2018), implemented in the "*go_enrichment*" Github repository (https://github.com/enormandeau/go_enrichment) and the go-basic.obo database (release 2019-03-19) with Fisher's exact tests. Our background gene list included the whole gene set used for differential expression after filtering for low coverage (n = 38,914 transcripts). Only

GO terms with $P < 0.05$ and including a minimum of three differentially expressed genes were considered. Significant GO enriched terms were used for semantic-based clustering in REVIGO (http://revigo.irb.hr/). We used a principal component analysis (PCA) on DEG data to visually explore the individuals clustering per condition using the *ggplot2* R package. Data are presented as mean ± standard deviation and all analyses were performed and graphics drawn in RStudio v3.5 statistics software.

Results

RNA Sequencing results

Sequencing yielded a mean of 19.21 ± 1.99 M raw reads per individual. After trimming, 92.23 ± 0.37 % of the reads were recovered and then used for downstream analyses. Mapping rate reached 62.90 ± 1.39 % (**Table S1**), with no significant differences among treatments (ANOVA, df = 3, F = 1.47, $P = 0.24$). The PCA (**Figure 1**) shows that axes 1 and 2 explain 17 and 11 % of the total variance, respectively, and that treatments 2.5 and 25 seemed more closely related compared with the 0.25 treatment. This was verified by hierarchical K-means clustering, as shown in **Figure 2**, where individuals from treatments 2.5 and 25 can be seen gathered in the same cluster compared to those from treatment 0.25 and the control. The correlation matrix (**Figure S1**) shows all individuals to be tightly correlated to each other, ranging from r = 0.69 to r = 0.91 (Pearson's correlation). The maximum mean Pearson's correlation across all individuals is 0.87 ± 0.03 (N = 38,913 genes total), suggesting that overall intra-group variation is limited (**Figure S1**).

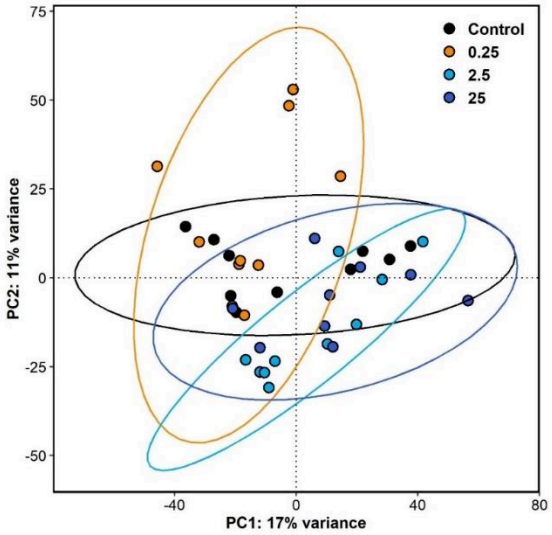


Figure 1. PCA plot of individuals with 95% confident interval ellipses for each micro-PS concentration (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) and the control; n = 10 individuals per treatment, except for 25 µg L^{-1} where n = 9.

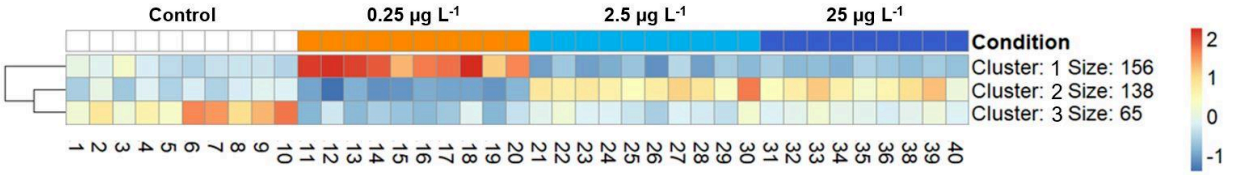


Figure 2. Heatmap of differentially expressed genes (DEGs) over all micro-PS treatments. A common response between 2.5 and 25 µg L^{-1} is highlighted by clusters 1 and 2 showing a similar pattern of DEGs.

Common transcriptomic response shown across micro-PS doses

We identified a total of 359 DEGs (|Log2FC| > 2; FDR < 0.01) between micro-PS (all concentrations included) and control treatments: with 54.32 % of the genes annotated according to Uniprot entries (**Figure 3**). We found a total of 19 common DEGs across all comparisons (regardless of the expression profiles) with only nine having a significant match on Uniprot (**Table S2**). Specifically, we found pervasive down-regulation of the cytochrome P450 2D11 (*cyp2d11*), glutathione-S-transferase 1 (*gst1*, **Figure 4**-A), sulfotransferase 1C4 (*sult1c4*) and ATP-binding cassette B1 (*abcb1*) coding genes in all micro-PS treatments compared with the control. These genes are all involved in the xenobiotic detoxification pathway. Similarly, the bile salt-activated lipase (*CEL*) and actin genes were also down-regulated in all MP treatments compared with the control. In addition, we found dose-specific effects on gene expression that mostly differentiated the 0.25 treatment from the 2.5 and 25 treatments. For instance, the organic cation transporter (*orct*) and solute carrier family 22 member 21 (*slc22a21*) genes, which have a fundamental role in xenobiotic excretion and energy metabolism, were down-regulated in the 0.25 treatment but up-regulated in the 2.5 and 25 treatments compared with the non-exposed control treatment. Inversely, the myeloid differentiation primary response 88 (*myd88*), a specific gene of the immune process, was up-regulated in the 0.25 treatment but down-regulated in the two other micro-PS treatments compared with the control (**Figure 4**-C). We note that all the 19 common genes responded in a similar fashion (up- or down-regulated) in the 2.5 and 25 treatments (**Table S2**). The complete list of DEGs with associated log2FC values are reported in **Table S3**.

Differential abundance of transcripts with the lowest MP dose exposure

We found a total of 133 and 112 genes up and down-regulated, respectively, in the 0.25 treatment compared with the control (**Figure 3**). Enriched GO encompassed several biological processed related to oxidoreductase activity and glutathione metabolism, including the glutathione derivative biosynthetic process (GO: 1901685; $log_{10}P$: -7.07, GO:1901687; $log_{10}P$: -

7.07, GO:0015038; $log_{10}P$: -5.68), but also toxin catabolic process (GO:0009407; $log_{10}P$: -5.39). Interestingly, DEGs up-regulated in the 0.25 µg L^{-1} treatment only included *gsto1*, up-regulated, as well as two toll-like receptors (*tlr2* and *tlr13*), *myd88*, *hsp70*, and *hsp71* (**Figure 4**). The subset of common DEGs between the 0.25 and other micro-PS treatments provides further information on biological functions likely to be involved in the dose-specific response to micro-PS exposition. DEGs significantly enriched in treatments 0.25 and 2.5 µg L^{-1} included genes related to biological functions such as catalytic activity (GO: 0003824; $log_{10}P$: -3.64), iron ion binding (GO: 0005506; $log_{10}P$: -4.62), lipid metabolic process (GO: 0006629; $log_{10}P$: -3.63), and steroid metabolic process (GO: 0008202; $log_{10}P$: -3.48). The subset of common DEGs between 0.25 and 25 µg L^{-1} *vs* the control, revealed enrichment for GOs such as transport of components like anions (GO: 0006820; $log_{10}P$: -3.99), ions (GO: 0006811; $log_{10}P$: -3.41), and nitrogen compounds (GO: 0044271; $log_{10}P$: -3.13. Generally, DEGs from the lowest micro-PS treatment at 0.25 µg L^{-1} were outliers compared to 2.5 and 25 µg L^{-1} (**Figure 4**). Details of all GO enrichments are provided in Supplementary **Table S4**.



Figure 3. Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs) in each condition compared to the control (|Log2FC| > 2; FDR < 0.01) and shared between up- and down-regulated genes. The total number of DEGs in micro-PS conditions amount to 245, 112 and 96 in 0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}, respectively.

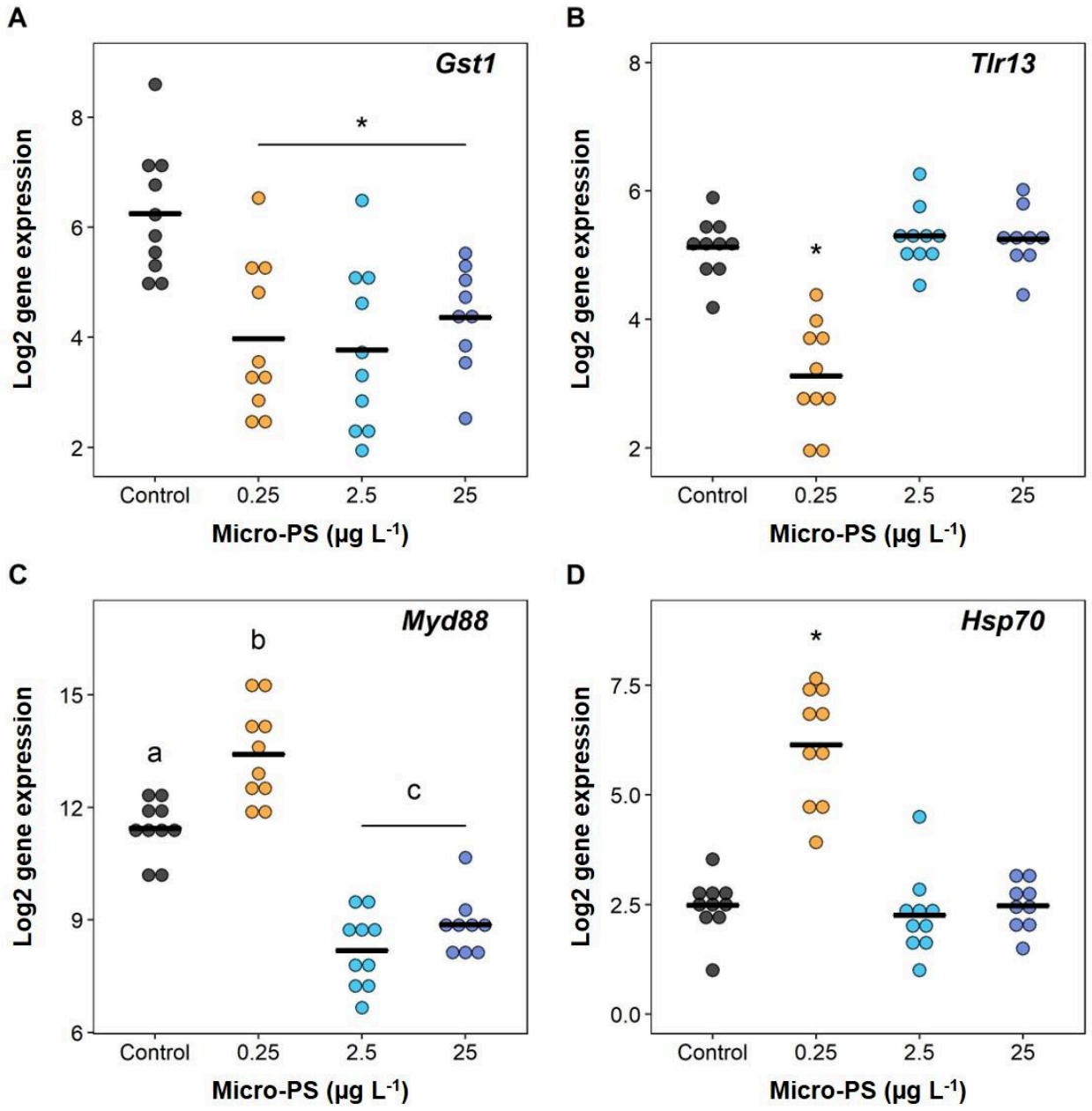


Figure 4. Dot plots of the expression of genes involved in stress and immune response in the pearl oyster *Pinctada margaritifera* after a 2-month exposure to micro-PS. (**A**) glutathione-S-transferase 1 (*gst1*), (**B**) toll-like receptor 13 (*tlr13*), (**C**) myeloid differentiation primary response 88 (*myd88*), and (**D**) heat shock protein 70 (*hsp70*). Significant differences between control and treatments (|Log2FC| > 2 and FDR < 0.01) are represented by an asterisk ("*") or with letters when several inter-groups differences occurred.

Response to maximum micro-PS concentration exposure

In 2.5 µg L^{-1}, 59 *vs* 53 genes were up- and down-regulated, respectively, compared with the control (**Figure 3**). Lactase activity (GO:0000016; $log_{10}P$: -7.71) and glycosylceramidase activity

(GO:0017042; $log_{10}P$: -7.71), which take part in energy metabolism, were highlighted by down-regulation of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) coding gene. We again found enrichment for oxidoreductase activity (GO:0016712; $log_{10}P$: -5.89), and heme binding (GO:0020037; $log_{10}P$: -5.65), which was associated with a dramatic down-regulation of several cytochrome P450-related genes such as *cyp3a56*, *cyp17a1*, *cyp2j6*, *cyp1a1*, *cyp2d11*, and *cyp2c8*. We also found significantly enriched GOs involved in cell death (GO:008219; $log_{10}P$: -2.30), including down-regulation of *birc2*, and *myd88*.

In 25 µg L^{-1}, we observed 51 *vs* 45 genes up- and down-regulated, respectively, compared with the control (**Figure 3**), again including cytochrome P450-related genes (*cyp3a56*, *cyp2d11*, *cyp2c23*, and *cyp2c8*) involved in oxidoreductase activity (GO:0016712; $log_{10}P$: -3.66). All cytochromes P450 were up-regulated, while the genes of organic anion transmembrane transporter activity (GO:0008514; $log_{10}P$: -3.29) (SLC family) were down-regulated. These transporter genes, together with the *abcb1* genes up-regulated in 25 µg L^{-1} treatment, are also included in drug transmembrane transporter activity (GO:0015238; $log_{10}P$: -3.10). Details of all GOs enrichments are provided **in Table S5** and **Table S6**. Finally, we noted that treatments 2.5 and 25 shared 31 common DEGs (18 up- and 13 down-regulated) with similar patterns and levels of mRNA expression. The GO enrichment analysis revealed that most of enriched functions for these common genes are linked to oxygen metabolism, including mono-oxygenase activity, oxidoreductase activity (acting on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen) and heme binding.

A complementary experimentation served to dectect putative changes in bacterial load and microbe's community assemblies in the mix of water and algae with or without addition of micro-PS is available in the SI file. We observed no significant difference in total bacterial load or in bacterial community across conditions ($P > 0.05$).

Discussion

The transcriptomic approach shows that energy, stress, and immune-related genes appear profoundly impacted by micro-PS exposure but that the main biomineralization-related genes (Joubert *et al.*, 2010; Yarra *et al.*, 2016) are not affected. However, we can not exclude the hypothesis that the overall energy deficiency induced by micro-PS exposure (Gardon *et al.*, 2018) may ultimately lead to a lower energy investment in the biomineralization process, as already demonstrated in previous experiments manipulating temperature and food availability (Joubert *et al.*, 2014; Le Moullac *et al.*, 2018). How reduced energy, and the associated growth of oysters would ultimately affect pearl quality (mostly total pearl nacreous deposit) still needs to be assessed in depth since it is a major criterion for the economic sector that depends on this species.

Long-term exposure to micro-PS impairs detoxification and oxidative response in pearl oyster

Detoxification and oxidative responses became inactivated after 2 months of exposure to micro-PS, regardless of the concentration. We found several genes involved in xenobiotic detoxification pathways to be down-regulated in all micro-PS treatments compared with the control. Among these genes, *gst*, a widely-used marker of oxidative stress, was down-regulated by a micro-PS concentration as low as 0.25 µg L^{-1}. GST is usually involved in xenobiotic detoxification during phase II biotransformation, which is characterized by an oxidation by CYP450 (phase I monooxygenase reaction) followed by a conjugation to an anionic group like GST, or SULT which usually creates a more water-soluble compound (Wang *et al.*, 2018). Some GSTs are central actors in the elimination of reactive oxygen species (ROS), which show an increased production during aerobic cell activity following environmental stress and that have detrimental consequences for host homeostasis and metabolic balance (Donaghy *et al.*, 2015; Manduzio *et al.*, 2015). Our results contrast in some ways with recent findings in *Mytilus galloprovincialis*, where up-regulation of *gst* was shown in mantle tissue only after a second 18-day exposure to micro-PS at 30 µg L^{-1} (Détrée and Gallardo-Escárate, 2018). This difference should not come as such a surprise since *gst* expression and GST enzyme activities show large variations (including seasonal variation;Chainy *et al.*, 2016) and major discrepancies of response across experiments (Paul-Pont *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017). A recent meta-analysis on the impact of pollution on oxidative stress in marine organisms showed that GST activity tends to be reduced in response to pollutants (Isaksson, 2010). Hence, while short-term exposure to MP and other pollutants might trigger GST gene expression or activity (Lüchmann *et al.*, 2015; Milan *et al.*, 2016; Pessatti *et al.*, 2016), their inactivation here (compared with the control) should lead to the incapacity of individuals to maintain proper detoxification pathways in the long run, most likely resulting in chronic oxidative stress and oxidative damage (Araújo *et al.*, 2016). One reasonable hypothesis for such impairment is the progressive dose-dependent energy budget decline (ranging from –48.4 to –101.3 J h^{-1} g^{-1} dw compared to control) in pearl oysters exposed to micro-PS (Gardon *et al.*, 2018) leading to a transition towards stress conditions in the pessimum range (Sokolova, 2013). Ideally, further data on downstream genes as well as protein activity would confirm our observations. However, even lower doses ultimately reduce individual fitness, as no compensatory mechanisms are satisfactory with regard to total energy budget (39.7 ± 19.9 J h^{-1} g^{-1} dw), which prompts questions concerning population resilience. Our results also highlight the importance of interpreting biomarkers such as detoxification activity in the context of individual energetic potential, enabling conclusions to be drawn about the biological effect of stressful conditions. Similarly, to properly quantify the effect of any stressor, at both individual and population levels, we stress the need for long-term

experiments coupled with non-a priori transcriptomic approaches for the integration of these techniques in ecotoxicology. This would allow the detection of potential acclimation mechanisms or simple accumulative effects, enabling their interpretation to be disentangled from limited short-term stress responses.

Response to micro-PS considering the energy tolerance to stress model

Overall, transcriptomic activity and breakdowns in stress-specific response were observed between lower and higher micro-PS doses (0.25 µg L^{-1} *vs* 2.5 and 25 µg L^{-1}). We noticed that the overall number of differentially expressed genes relative to the control was more than double in the 0.25 µg L^{-1} treatment (n = 245) compared with the higher micro-PS treatments (2.5 µg L^{-1}, n = 112 and 25 µg L^{-1}, n = 96). Similarly, several biomarker genes and biological functions affected here correspond to different physiological stages of the individuals among the MP doses tested; hence supporting the energy budget results previously obtained on the same individuals (Gardon *et al.*, 2018). In the concept of energy-limited tolerance to stress proposed by Sokolova (2013), a gradient of conditions, ranging from optimal to lethal, are characterized by specific biomarker activities coupled to physiological status (Sokolova, 2013). We showed that, after a 2-month exposure to 0.25 µg L^{-1} of micro-PS, pearl oysters display a significant reduction in their total energetic budget together (–48.4 J h^{-1} g^{-1} dw) with up-regulation of stress-related genes, including *hsp70* and *hsp71*. HSPs are molecular chaperones responsible for protecting protein structure and functioning from oxidative stress (Pörtner, 2012). Elevated expression of HSPs and high energetic cost associated with protein synthesis are hallmarks of the pejus condition, characterized by a reduced fitness but positive growth and reproduction (Sokolova, 2013). Individuals exposed at 0.25 µg L^{-1} indeed showed no significant reduction in gonadic status, but had lower fitness in terms of scope for growth (39.7 ± 19.9 J h^{-1} g^{-1} dw), which was significantly lower than controls (88.1 ± 23.1 J h^{-1} g^{-1} dw; Gardon *et al.*, 2018). *Hsp* expression was low to absent in higher MP dose treatments. Together with the overall lower number of DEGs (mostly down-regulated), strong reduction of the overall energy budget, and certainly the oxidative stress response (through inactivation of normal detoxification response), individuals exposed to higher doses showed typical physiological and molecular signs of pessimum (or lethal) environmental conditions, representing a high or extreme degree of stress (Sokolova, 2013). Ultimately, it would not be possible to sustain such dramatic effects on individual fitness in the long term, mostly likely leading to lower survival. It is relevant to note that such results were observed in experimental conditions of abundant (*ad libitum*) food and oxygen supply, and constant and optimal temperature conditions. Such parameters are variable in environmental conditions, leading to a multiple stressor context with combined effects that could have a more profound impact on marine organisms (Ferreira *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2018). Thus, there is a vital need to

investigate the interactions of multiple stressors (exposome) with MP exposure in the context of climate change to predict population resilience and improve conservation plans, keeping in mind that MP exposure has to be as realistic as possible, considering such aspects as shape, size, ruggedness, interaction with organic matter, and biological and chemical MP loads.

Sources of stress induced by micro-PS

Exposure to micro-PS causes common molecular stress responses, which are also observed when marine mollusks are exposed to chemical pollutants or bacterial challenges (Green *et al.*, 2015). Because, at the higher doses, overall immune response was supposedly mostly constrained by low energy budget, we focused on the 0.25 µg L^{-1} treatment with the goal of disentangling the possible sources of micro-PS-related stress. We found that the signaling adaptor protein-coding gene (*myd88*), a central actor in the Toll Like Receptors (TLRs) pathways, was significantly up-regulated in the 0.25 µg L^{-1} treatment. The *myd88* gene is well recognized as having a crucial role in inducing activation of hemocytes and various inflammatory cytokine genes within the NF-kB pathway (Lee *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Ning *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2016). Inversely, we showed that two TLRs, including TLR13, which specifically recognizes bacterial 23S rRNA, were down-regulated in the 0.25 µg L^{-1} micro-PS treatment. Pathogen-specific pattern recognition (*e.g.* lipopolysaccharide, lipoprotein, peptidoglycan, and lipoteichoic acid) by TLRs leads to pro- and anti-inflammatory cytokine gene activation, with downstream effects on inflammation response, cell proliferation and communication, and defense against bacterial and viral infections (Wang *et al.*, 2018; Toubiana *et al.*, 2013; Gerdol *et al.*, 2018). Here, we detected no significant difference in total bacterial load nor diversity or variation in bacterial communities across treatments. Thus, inactivation of the TLR receptor, together with the absence of difference in bacterial load or bacterial community suggest that specific MyD88 pathways were most likely not triggered by bacterial pathogens, which therefore does not support the hypothesis of micro-PS as an aggregating structure in the present study. However, activation of *myd88* indicates activity of the immune system function and is relevant in the context of the "stress-memory" immune response, as discussed by Détrée and Gallardo-Escárate (2018), who observed MyD88 only during a second exposure to polyethylene microbeads in mussel. Admittedly, our experimental design did not allow us to explore the possibility that micro-PS would impact individuals' microbiota communities (X. Wu *et al.*, 2019), or other "non-self" organisms such as virus or fungi, or the presence of a "danger-signal", all of which would be of interest for further specific study. Furthermore, our experiment was limited to a 24-h period, but biofilms are very dynamic during first hours/days and bacterial communities might therefore require more time to stabilize (Dang and Lovell, 2000; Harrison *et al.*, 2014). Potentially, the inactivation of detoxification process would favor the production of a damage-associated

molecular pattern (DAMP) according to the model proposed by Matzinger (2002), but further in-depth mechanistic studies need to be conducted to assess the origin of MP-induced stress.

Conclusions

Homeostasis, stress, and detoxification showed no sign of dose-dependent responses to micro-PS concentration, but were impacted by the long-term polystyrene microbead exposure. Immune response and detoxification capacities are mostly limited and hampered by lower energetic budget in pearl oysters exposed to micro-PS. The reduction of energetic budget should increase basal metabolic rate to the detriment of other energy demanding compartments (mainly reproduction), significantly lowering Darwinian fitness. Certainly, at higher doses, physiological maintenance would become difficult. This study supports the use of the energy-limited tolerance to stress model in the context of micro-PS exposure and refine treatment-specific associated markers at molecular levels. Our work lays the foundation for exploring pathways and gene expression under experimental MP exposure in ecologically and economically important marine bivalves such as *P. margaritifera* to allow them to be tested in complex *in situ* systems. Finally, this study also highlights possible divergence in markers response across studies focusing on physiological impacts of micro-plastics; ideally, a comprehensive approach, including genes expression, protein activities and deeper knowledge on bivalve's immunity would serve our understanding of MP-associated risk in marine ecosystems.

Supplementary information

The SI contains the sequencing results and read survival after trimming and mapping (**Table S1**); a correlation matrix between micro-PS concentrations (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) and control conditions (**Figure S1**); the differentially expressed genes over all micro-PS treatments (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) compared with non-exposed (control) conditions (**Table S2**); a list of DEGs for pairwise comparisons with associated Log2FC (**Table S3**); the Gene Ontology enrichment based on DEGs highlighted in the 0.25, 2.5 µg L^{-1} and 25 µg L^{-1} treatment after semantic-based clustering in REVIGO (**Table S4**, **S5**, **S6**); the metabarcoding approach with associated material and methods section and results section including a boxplot of total bacterial quantity in the different treatments (control, 0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}), following the samplings at T0 and T24 (**Figure S2**); the relative OTU representation among variables (treatment, time, experiences) (**Figure S3**); the statistical analysis of the treatment effects on the unweighted UniFrac values (**Table S7**); the metabarcoding taxonomic results on families at T0 and T24 among treatments (RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 15.98, $P < 0.001$) (**Figure S4**) and a references section.

Table S1. Sequencing results and reads survival after trimming and mapping. No significant differences were observed between individuals (ANOVA, df = 3, F = 1.47, *P* = 0.24).

Individual	Condition (µg L^{-1})	Input Read Pairs	Both Surviving	Mapped
1	0 (control)	2.15×10^7	1.99×10^7	1.39×10^7
2	0 (control)	1.93×10^7	1.77×10^7	1.23×10^7
3	0 (control)	2.04×10^7	1.87×10^7	1.28×10^7
4	0 (control)	1.66×10^7	1.54×10^7	1.05×10^7
5	0 (control)	2.01×10^7	1.85×10^7	1.29×10^7
6	0 (control)	1.86×10^7	1.71×10^7	1.20×10^7
7	0 (control)	1.99×10^7	1.83×10^7	1.31×10^7
8	0 (control)	1.81×10^7	1.65×10^7	1.11×10^7
9	0 (control)	2.01×10^7	1.85×10^7	1.28×10^7
10	0 (control)	1.62×10^7	1.50×10^7	9.83×10^6
11	0.25	1.89×10^7	1.74×10^7	1.19×10^7
12	0.25	1.61×10^7	1.49×10^7	1.02×10^7
13	0.25	2.33×10^7	2.14×10^7	1.48×10^7
14	0.25	1.97×10^7	1.82×10^7	1.22×10^7
15	0.25	1.65×10^7	1.52×10^7	1.03×10^7
16	0.25	1.94×10^7	1.80×10^7	1.26×10^7
17	0.25	2.19×10^7	2.03×10^7	1.36×10^7
18	0.25	2.24×10^7	2.08×10^7	1.43×10^7
19	0.25	1.83×10^7	1.69×10^7	1.13×10^7
20	0.25	1.94×10^7	1.80×10^7	1.24×10^7
21	2.5	1.76×10^7	1.62×10^7	1.08×10^7
22	2.5	1.88×10^7	1.73×10^7	1.19×10^7
23	2.5	2.17×10^7	2.01×10^7	1.34×10^7
24	2.5	2.06×10^7	1.90×10^7	1.31×10^7
25	2.5	1.91×10^7	1.76×10^7	1.20×10^7
26	2.5	1.96×10^7	1.80×10^7	1.22×10^7
27	2.5	1.83×10^7	1.69×10^7	1.08×10^7
28	2.5	1.73×10^7	1.59×10^7	1.10×10^7
29	2.5	1.86×10^7	1.71×10^7	1.18×10^7
30	2.5	1.83×10^7	1.69×10^7	1.09×10^7
31	25	1.94×10^7	1.80×10^7	1.24×10^7
32	25	2.13×10^7	1.97×10^7	1.33×10^7
33	25	1.79×10^7	1.66×10^7	1.09×10^7
34	25	1.33×10^7	1.22×10^7	8.31×10^6
35	25	2.10×10^7	1.94×10^7	1.34×10^7
36	25	2.04×10^7	1.88×10^7	1.28×10^7
38	25	1.94×10^7	1.78×10^7	1.24×10^7
39	25	2.19×10^7	2.02×10^7	1.42×10^7
40	25	1.78×10^7	1.64×10^7	1.10×10^7

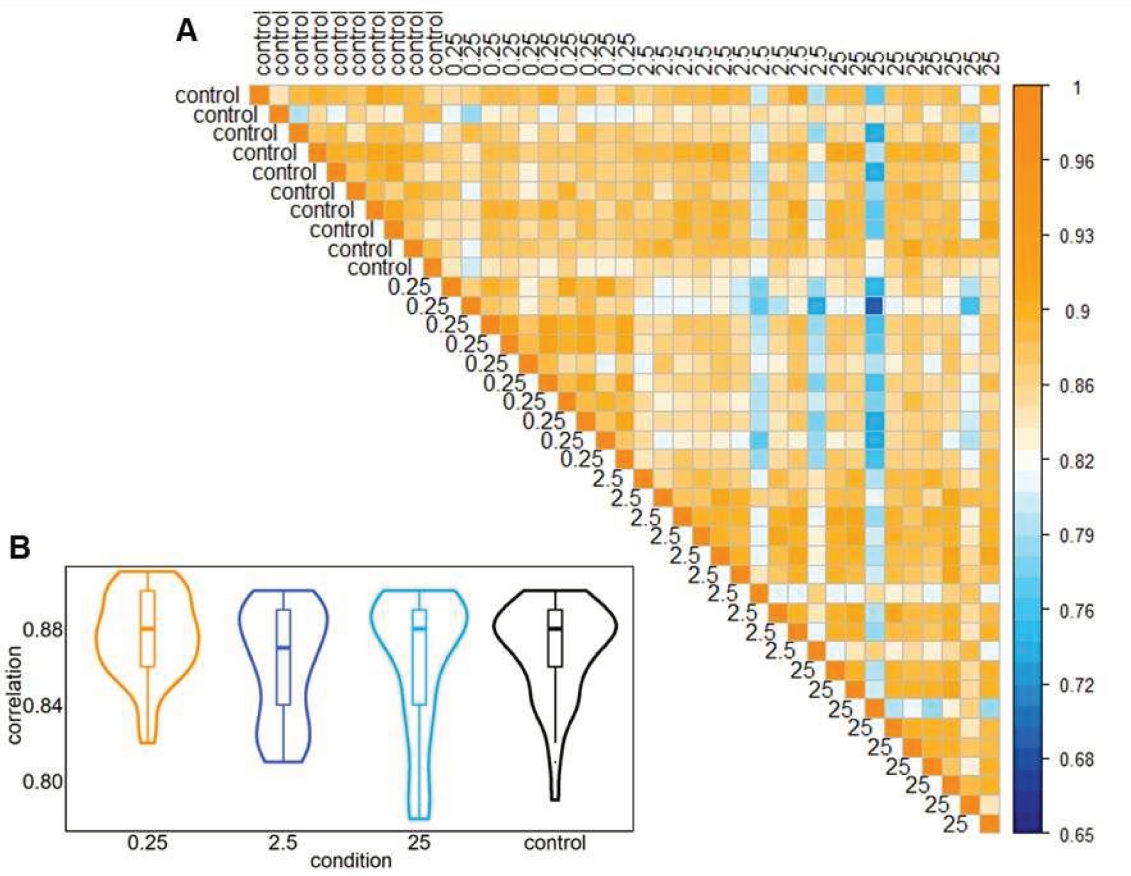


Figure S1. Correlation matrix between micro-PS concentrations (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) and control conditions. (A) Intra- and inter-group variation observations. (B) Violin plot of intra-group variation.

Table S2. Differentially expressed genes over all micro-PS treatments (0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}) compared with non-exposed (control) conditions. Values represent Log2 fold change (log2FC) for genes significantly expressed (FDR < 0.01). N/A means that gene name of the protein does not exist on Uniprot.

DEG	Protein	Log2FC 0.25/Control	Log2FC 2.5/Control	Log2FC 25/Control
Myd88	Myeloid differentiation primary response protein	2.31	-3.13	-2.49
Abcb1	Multidrug resistance protein 1	-2.20	-2.24	-2.69
Slc22a21	Solute carrier family 22 member 21	-3.17	2.71	2.42
Cel	Bile salt-activated lipase	-5.12	-4.12	-4.55
Orct	Organic cation transporter protein	-3.66	2.52	2.59
Sult1c4	Sulfotransferase 1C4	-2.09	-3.59	-3.40
Cyp2d11	Cytochrome P450 2D11	-3.25	-2.12	-2.77
Gst1	Glutathione S-transferase 1	-2.18	-2.32	-2.20
N/A	Actin, cytoplasmic	-5.64	-5.04	-6.04

Table S3. List of DEGs for pairwise comparisons with associated Log2FoldChange. Positive Log2FC indicate down-regulation compared to control. N/A means that gene name of the protein and corresponding species do not exist on Uniprot.

Condition	Trinity ID	Log2FC	Pvalue	FDR	Uniprot ID	Uniprot *sp.*
0.25/Control	TRINITY_DN79715_c0_g1_i1	-5.64	3.25E-14	2.31E-12	ACTC	BRAFL
0.25/Control	TRINITY_DN64957_c2_g1_i2	-5.13	1.83E-08	4.69E-07	CEL	BOVIN
0.25/Control	TRINITY_DN68364_c0_g5_i1	-4.49	4.46E-08	1.04E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN63876_c4_g2_i1	-4.03	1.74E-12	9.68E-11	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN58769_c0_g1_i3	-4.00	1.58E-04	1.44E-03	LAC6	ARATH
0.25/Control	TRINITY_DN78649_c4_g2_i6	-3.93	5.11E-16	4.62E-14	WWOX	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN83526_c2_g3_i2	-3.81	4.73E-11	2.00E-09	EAA1	BOVIN
0.25/Control	TRINITY_DN58584_c0_g1_i2	-3.70	1.76E-10	6.72E-09	EAA4	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN59906_c0_g1_i3	-3.68	2.36E-05	2.83E-04	CAH14	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN61026_c4_g7_i5	-3.66	7.53E-09	2.08E-07	ORCT	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN76194_c0_g3_i3	-3.45	3.01E-04	2.48E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN80924_c0_g2_i1	-3.25	1.71E-04	1.54E-03	CP2DB	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN63980_c0_g2_i2	-3.17	1.98E-07	4.03E-06	S22AL	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN64665_c1_g2_i1	-3.17	3.13E-08	7.57E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN60042_c0_g1_i1	-3.14	3.94E-09	1.16E-07	CALM	HALOK
0.25/Control	TRINITY_DN70307_c4_g1_i7	-3.11	6.46E-13	3.89E-11	TPMT	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN78076_c3_g1_i1	-3.10	1.50E-08	3.90E-07	AK1BA	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN66849_c1_g4_i1	-3.08	8.56E-07	1.51E-05	RDH12	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN77379_c0_g1_i2	-3.01	3.18E-06	4.90E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN75538_c0_g1_i6	-2.89	1.91E-09	5.98E-08	CAHZ	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN75844_c0_g1_i2	-2.81	1.44E-04	1.32E-03	TYRO	PINMA
0.25/Control	TRINITY_DN62220_c2_g2_i4	-2.74	7.93E-07	1.42E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN83398_c3_g1_i1	-2.69	4.18E-09	1.22E-07	GSTO1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN73050_c0_g1_i1	-2.66	8.31E-05	8.34E-04	PWAP	HALAI
0.25/Control	TRINITY_DN80924_c1_g3_i1	-2.61	2.29E-05	2.76E-04	CP2CN	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN65229_c5_g1_i2	-2.60	1.15E-03	7.46E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN80046_c0_g1_i2	-2.58	2.33E-10	8.72E-09	GSTO1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN82701_c0_g2_i5	-2.57	1.48E-08	3.88E-07	KLD8A	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN73411_c1_g1_i2	-2.57	3.39E-14	2.39E-12	DOPDB	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN62969_c6_g3_i1	-2.54	3.22E-04	2.63E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN83475_c5_g2_i2	-2.53	3.08E-05	3.56E-04	T2EB	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN64372_c2_g3_i1	-2.53	1.78E-06	2.91E-05	CAH2	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN75123_c0_g1_i3	-2.51	8.58E-05	8.54E-04	Y381	RICFE
0.25/Control	TRINITY_DN66476_c1_g2_i4	-2.49	3.26E-07	6.36E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN70992_c0_g1_i3	-2.49	4.85E-04	3.69E-03	DHGL	DROPS
0.25/Control	TRINITY_DN85354_c2_g2_i2	-2.49	3.60E-04	2.87E-03	ARSJ	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN66849_c1_g1_i3	-2.49	2.90E-11	1.27E-09	RDH12	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN50370_c0_g1_i4	-2.48	4.43E-04	3.42E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN73060_c3_g1_i2	-2.47	6.87E-05	7.13E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN57200_c0_g1_i2	-2.44	5.58E-06	8.11E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN75297_c0_g4_i3	-2.44	9.53E-07	1.66E-05	DHRSX	HUMAN

0.25/Control	TRINITY_DN74567_c0_g1_i2	-2.44	4.42E-16	4.02E-14	XKR6	TETNG
0.25/Control	TRINITY_DN63069_c2_g7_i1	-2.43	3.50E-09	1.04E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN78619_c0_g2_i1	-2.43	7.43E-07	1.34E-05	KI18A	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN60189_c0_g1_i3	-2.43	7.24E-10	2.43E-08	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN84345_c6_g1_i3	-2.42	9.56E-05	9.36E-04	TLR22	CHICK
0.25/Control	TRINITY_DN86344_c3_g1_i7	-2.40	1.13E-12	6.62E-11	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN79742_c1_g1_i1	-2.40	1.01E-15	8.67E-14	CP2BJ	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN61385_c3_g2_i5	-2.39	2.68E-11	1.18E-09	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71932_c0_g3_i1	-2.38	6.23E-06	8.89E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN82810_c0_g1_i2	-2.38	2.69E-22	5.03E-20	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN69247_c4_g4_i4	-2.37	8.75E-12	4.22E-10	CAH14	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN85423_c2_g1_i6	-2.36	2.30E-04	1.97E-03	OXLA	BUNMU
0.25/Control	TRINITY_DN76372_c1_g1_i4	-2.36	1.03E-04	1.00E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN62937_c6_g1_i2	-2.34	4.34E-12	2.23E-10	CBR1	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN72185_c1_g1_i4	-2.32	8.52E-11	3.40E-09	YAJO	ECOLI
0.25/Control	TRINITY_DN79062_c0_g2_i1	-2.31	2.91E-04	2.41E-03	CHRR	SHIFL
0.25/Control	TRINITY_DN65228_c1_g3_i1	-2.30	8.60E-04	5.87E-03	ST1A1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN72091_c0_g1_i1	-2.30	5.10E-05	5.50E-04	SSUH2	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN61826_c1_g2_i2	-2.28	2.54E-04	2.15E-03	DHGL	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN80924_c0_g1_i1	-2.27	6.04E-05	6.37E-04	CP2J6	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN81318_c0_g2_i2	-2.27	2.81E-12	1.49E-10	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN61786_c0_g2_i2	-2.27	9.54E-04	6.41E-03	KARG	HALMK
0.25/Control	TRINITY_DN64118_c0_g1_i1	-2.26	6.53E-08	1.46E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN81879_c7_g1_i3	-2.26	3.04E-13	1.92E-11	CP1A1	ORYLA
0.25/Control	TRINITY_DN88452_c5_g1_i14	-2.25	2.86E-06	4.47E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN66562_c0_g2_i6	-2.24	5.12E-04	3.84E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN61826_c1_g1_i2	-2.24	5.94E-04	4.33E-03	DHGL	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN78912_c1_g2_i2	-2.24	2.89E-04	2.40E-03	GSTO1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN76322_c1_g2_i6	-2.24	2.88E-14	2.06E-12	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN81879_c7_g3_i2	-2.23	5.77E-04	4.24E-03	CP17A	ICTPU
0.25/Control	TRINITY_DN58052_c0_g1_i4	-2.23	8.40E-21	1.38E-18	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN85086_c2_g1_i2	-2.23	8.11E-05	8.18E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN66026_c3_g2_i2	-2.20	6.14E-08	1.39E-06	MDR1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN72087_c1_g2_i1	-2.19	1.39E-03	8.74E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN77465_c1_g1_i1	-2.19	5.26E-06	7.68E-05	MGST1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN56148_c0_g1_i1	-2.18	1.17E-05	1.54E-04	GST1	ONCVO
0.25/Control	TRINITY_DN42302_c0_g1_i1	-2.17	3.51E-04	2.82E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN83587_c0_g1_i8	-2.17	7.04E-05	7.28E-04	RTBS	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN75972_c0_g1_i3	-2.17	9.94E-10	3.25E-08	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN75194_c0_g1_i2	-2.16	1.35E-05	1.74E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN66975_c0_g1_i1	-2.15	1.53E-03	9.43E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN82577_c1_g2_i9	-2.14	1.44E-05	1.85E-04	GPR	ECOLI
0.25/Control	TRINITY_DN59879_c5_g2_i4	-2.14	2.31E-05	2.78E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN75285_c0_g1_i3	-2.14	3.84E-07	7.36E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN76453_c1_g1_i6	-2.13	9.45E-05	9.27E-04	N/A	N/A

0.25/Control	TRINITY_DN67128_c4_g3_i1	-2.13	1.75E-04	1.57E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN87429_c0_g1_i1	-2.13	8.56E-06	1.18E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74028_c4_g4_i1	-2.12	9.50E-04	6.38E-03	CELR3	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN83833_c4_g3_i1	-2.11	1.80E-50	3.13E-47	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN60801_c0_g1_i2	-2.09	6.71E-15	5.26E-13	ST1C4	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN74956_c5_g3_i7	-2.09	3.80E-05	4.26E-04	GGLO	PIG
0.25/Control	TRINITY_DN81318_c0_g1_i4	-2.08	1.71E-10	6.53E-09	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74877_c0_g1_i6	-2.08	7.30E-06	1.02E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN76029_c1_g2_i1	-2.07	1.77E-05	2.21E-04	TRS1	STRTI
0.25/Control	TRINITY_DN82478_c0_g1_i9	-2.06	2.73E-06	4.29E-05	SIBA	DICDI
0.25/Control	TRINITY_DN85833_c2_g2_i3	-2.06	1.18E-03	7.66E-03	ST1C2	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN61159_c0_g2_i1	-2.05	2.96E-04	2.45E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN85796_c1_g1_i4	-2.05	7.59E-08	1.69E-06	YQK4	CAEEL
0.25/Control	TRINITY_DN66151_c6_g1_i9	-2.05	1.37E-11	6.30E-10	CP17A	SQUAC
0.25/Control	TRINITY_DN66798_c0_g1_i1	-2.04	3.87E-15	3.18E-13	TLR13	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN78281_c1_g1_i4	-2.04	6.09E-08	1.38E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN62898_c0_g1_i1	-2.03	1.28E-03	8.16E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN87719_c6_g2_i4	-2.03	1.10E-05	1.46E-04	VIT2	FUNHE
0.25/Control	TRINITY_DN83450_c1_g1_i5	-2.02	1.31E-21	2.32E-19	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN58440_c0_g1_i2	-2.01	1.44E-04	1.33E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74170_c2_g1_i10	-2.01	6.52E-11	2.66E-09	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74474_c1_g1_i2	-2.01	1.40E-03	8.79E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN77039_c5_g1_i6	-2.01	7.37E-04	5.19E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71052_c0_g1_i2	-2.01	1.15E-15	9.75E-14	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN80620_c5_g1_i8	-2.00	3.29E-04	2.67E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN84852_c1_g1_i6	-2.00	1.39E-04	1.29E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN85984_c2_g1_i1	2.00	5.07E-24	1.13E-21	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN55838_c0_g1_i2	2.00	6.60E-20	1.00E-17	FGFR1	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN59023_c0_g1_i1	2.00	7.18E-12	3.49E-10	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN87098_c3_g1_i3	2.01	1.23E-17	1.43E-15	CTL5	XENTR
0.25/Control	TRINITY_DN57599_c0_g1_i1	2.01	6.02E-11	2.48E-09	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN64546_c0_g1_i4	2.01	4.78E-39	3.09E-36	UCP3	BOVIN
0.25/Control	TRINITY_DN72529_c0_g1_i2	2.01	8.43E-16	7.29E-14	CPTP	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN69559_c0_g1_i5	2.02	9.99E-19	1.32E-16	C27C1	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN69780_c5_g1_i2	2.02	9.45E-15	7.26E-13	CP2BB	CANLF
0.25/Control	TRINITY_DN70684_c5_g13_i1	2.04	1.41E-08	3.71E-07	MOS1T	DROMA
0.25/Control	TRINITY_DN87405_c3_g2_i1	2.04	2.93E-10	1.07E-08	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74058_c0_g1_i1	2.04	1.33E-28	4.50E-26	GBS76	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN82370_c0_g1_i1	2.06	3.61E-09	1.07E-07	DISP1	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN70846_c0_g2_i5	2.07	3.25E-07	6.36E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN78977_c2_g2_i2	2.08	2.17E-43	1.88E-40	P4H3	ARATH
0.25/Control	TRINITY_DN66689_c0_g2_i1	2.08	4.08E-10	1.44E-08	CCKAR	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN82433_c0_g2_i8	2.08	1.38E-12	7.89E-11	TSN33	BOVIN
0.25/Control	TRINITY_DN72691_c0_g2_i2	2.09	1.22E-04	1.15E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN62223_c3_g3_i1	2.09	3.70E-34	1.78E-31	FBX4	BOVIN

0.25/Control	TRINITY_DN62958_c1_g1_i2	2.11	1.86E-10	7.03E-09	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN60373_c4_g2_i1	2.12	4.63E-48	5.81E-45	DOT1L	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN78863_c1_g1_i7	2.13	9.96E-34	4.59E-31	PDE11	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN86000_c2_g2_i1	2.14	2.54E-20	3.96E-18	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71462_c0_g1_i1	2.14	2.02E-36	1.17E-33	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74802_c9_g1_i2	2.15	3.02E-08	7.34E-07	C1QT4	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN84384_c0_g1_i2	2.15	3.69E-32	1.51E-29	UN13B	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN82564_c1_g2_i8	2.17	3.33E-17	3.62E-15	BIRC2	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN62165_c0_g1_i2	2.17	4.60E-13	2.85E-11	YR811	MIMIV
0.25/Control	TRINITY_DN83810_c0_g1_i2	2.18	2.15E-15	1.79E-13	CES1D	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN88383_c5_g1_i2	2.18	5.67E-15	4.58E-13	FXRD2	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN79788_c0_g1_i8	2.18	3.24E-22	6.01E-20	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN63907_c0_g1_i2	2.19	5.24E-07	9.73E-06	TREA	APIME
0.25/Control	TRINITY_DN71504_c0_g1_i1	2.19	1.41E-09	4.50E-08	MOT14	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN59319_c0_g1_i1	2.20	7.06E-07	1.28E-05	RFX6	AILME
0.25/Control	TRINITY_DN72508_c5_g1_i2	2.20	6.02E-06	8.65E-05	HYKK	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN68272_c3_g2_i2	2.20	4.79E-76	3.61E-72	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN72731_c0_g2_i1	2.20	6.10E-15	4.85E-13	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN70555_c3_g2_i3	2.21	3.76E-17	4.04E-15	BDH	BOVIN
0.25/Control	TRINITY_DN85991_c1_g1_i1	2.22	8.54E-52	1.75E-48	GTR1	SHEEP
0.25/Control	TRINITY_DN72949_c2_g2_i1	2.22	1.85E-07	3.78E-06	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN79283_c1_g1_i2	2.23	4.02E-10	1.43E-08	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN81133_c0_g1_i8	2.24	1.44E-16	1.41E-14	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN85984_c2_g4_i1	2.24	1.62E-21	2.82E-19	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN79339_c1_g1_i2	2.24	6.98E-12	3.42E-10	VKT3	HETCR
0.25/Control	TRINITY_DN87405_c3_g1_i1	2.25	2.93E-13	1.85E-11	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN72375_c0_g1_i2	2.26	3.43E-05	3.89E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71616_c0_g1_i1	2.27	1.26E-20	2.04E-18	SYT4	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN82564_c1_g1_i1	2.28	2.91E-20	4.51E-18	BIR7A	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN81775_c0_g1_i7	2.28	9.36E-04	6.31E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN59758_c2_g1_i3	2.29	1.44E-06	2.41E-05	B3GT1	PONPY
0.25/Control	TRINITY_DN66154_c0_g1_i1	2.29	2.50E-22	4.75E-20	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN58184_c0_g1_i1	2.29	5.42E-05	5.80E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN54086_c0_g1_i1	2.30	6.29E-24	1.38E-21	CP3AB	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN62328_c2_g1_i15	2.30	1.60E-05	2.02E-04	SUREJ	STRPU
0.25/Control	TRINITY_DN83828_c0_g2_i5	2.31	4.13E-41	2.92E-38	MYD88	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN82187_c0_g1_i4	2.32	3.39E-04	2.74E-03	SC6A9	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN56043_c0_g1_i1	2.32	6.92E-11	2.80E-09	ARF12	CAEBR
0.25/Control	TRINITY_DN57337_c0_g2_i1	2.32	1.15E-04	1.10E-03	CAS4	EPHMU
0.25/Control	TRINITY_DN78310_c0_g1_i3	2.34	2.58E-08	6.37E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN65030_c0_g1_i1	2.35	9.80E-05	9.57E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN80002_c0_g1_i1	2.35	1.91E-04	1.70E-03	S39A6	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN65154_c0_g1_i14	2.37	1.01E-09	3.31E-08	MOT12	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN68529_c0_g1_i4	2.37	3.05E-42	2.46E-39	HIL	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN57150_c0_g1_i1	2.40	6.36E-07	1.16E-05	N/A	N/A

0.25/Control	TRINITY_DN75616_c4_g1_i1	2.45	1.07E-48	1.52E-45	KLH26	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN61290_c7_g1_i3	2.46	8.42E-12	4.08E-10	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN80262_c0_g1_i1	2.48	3.41E-21	5.66E-19	COCA1	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN85418_c3_g1_i3	2.48	4.50E-50	7.26E-47	STEA4	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN63562_c9_g1_i4	2.48	4.13E-24	9.33E-22	PA216	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN68724_c1_g1_i2	2.48	1.65E-68	9.33E-65	ANK3	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN82739_c4_g3_i2	2.50	4.13E-14	2.88E-12	MOT5	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN82307_c0_g3_i2	2.52	1.53E-21	2.69E-19	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN74441_c1_g2_i10	2.53	5.06E-05	5.47E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN81123_c0_g2_i2	2.53	5.36E-53	1.35E-49	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN70965_c0_g1_i8	2.53	2.17E-04	1.88E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN68577_c5_g1_i6	2.53	1.56E-17	1.76E-15	ARF	CRYNJ
0.25/Control	TRINITY_DN62362_c0_g2_i2	2.54	3.04E-18	3.75E-16	MEGF6	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN61536_c0_g1_i1	2.55	2.27E-24	5.33E-22	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN68466_c3_g1_i1	2.56	3.29E-10	1.19E-08	OX2R	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN71462_c0_g3_i1	2.57	4.88E-38	2.98E-35	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN73985_c1_g2_i2	2.59	7.80E-09	2.15E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN59740_c4_g1_i7	2.59	4.89E-15	3.96E-13	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN64543_c8_g1_i3	2.63	1.61E-05	2.03E-04	HERC4	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN82307_c0_g2_i2	2.64	6.96E-19	9.36E-17	SPR	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN72949_c2_g1_i2	2.65	1.24E-07	2.64E-06	RTJK	DROME
0.25/Control	TRINITY_DN54260_c0_g1_i1	2.68	8.95E-06	1.22E-04	NPT2B	RAT
0.25/Control	TRINITY_DN83889_c2_g4_i8	2.69	8.93E-46	9.17E-43	ETHE1	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN40910_c0_g1_i1	2.69	1.62E-12	9.17E-11	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN57984_c0_g1_i3	2.69	7.11E-04	5.04E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN68377_c0_g1_i2	2.71	1.58E-10	6.06E-09	S39AE	DANRE
0.25/Control	TRINITY_DN59117_c0_g1_i2	2.72	9.09E-04	6.15E-03	MYCT	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN75684_c2_g1_i6	2.75	9.40E-43	7.87E-40	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN84476_c1_g1_i6	2.75	2.49E-06	3.95E-05	BIR7B	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN60596_c0_g1_i3	2.76	7.96E-05	8.07E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN75314_c0_g1_i8	2.78	1.57E-48	2.08E-45	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN76755_c0_g1_i8	2.79	3.63E-16	3.36E-14	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN79286_c0_g1_i1	2.82	1.16E-44	1.09E-41	CP7A1	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN56359_c0_g1_i1	2.91	4.85E-06	7.13E-05	CCKAR	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN78937_c4_g1_i8	2.91	5.64E-06	8.18E-05	MYCT	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN53365_c0_g2_i1	2.91	3.69E-16	3.40E-14	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN78714_c0_g1_i6	2.92	8.58E-20	1.27E-17	NAS15	CAEEL
0.25/Control	TRINITY_DN67262_c0_g1_i2	2.97	6.12E-07	1.12E-05	DPGN	DIPMA
0.25/Control	TRINITY_DN75033_c1_g1_i1	2.98	7.65E-08	1.70E-06	CADH6	CHICK
0.25/Control	TRINITY_DN68583_c3_g2_i3	2.98	2.34E-34	1.15E-31	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN63137_c7_g2_i8	3.00	2.53E-08	6.27E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN59787_c0_g1_i1	3.06	1.02E-56	3.28E-53	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN70113_c0_g2_i3	3.07	3.12E-08	7.56E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN64093_c3_g2_i2	3.14	7.24E-47	7.79E-44	CDD	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN71231_c0_g1_i1	3.14	4.60E-17	4.86E-15	N/A	N/A

0.25/Control	TRINITY_DN72135_c0_g1_i6	3.17	9.44E-30	3.33E-27	UN93A	XENLA
0.25/Control	TRINITY_DN80566_c0_g1_i2	3.17	4.07E-14	2.85E-12	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN78908_c0_g1_i9	3.18	7.27E-16	6.37E-14	HOXX	BRADU
0.25/Control	TRINITY_DN65545_c0_g1_i1	3.20	8.16E-20	1.23E-17	NAS34	CAEEL
0.25/Control	TRINITY_DN66759_c0_g3_i1	3.22	1.48E-04	1.36E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN42466_c0_g1_i1	3.27	4.26E-12	2.20E-10	KCNB1	PIG
0.25/Control	TRINITY_DN57738_c0_g1_i1	3.41	2.03E-06	3.28E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN42525_c0_g1_i1	3.54	1.85E-05	2.29E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN21158_c0_g1_i1	3.77	9.53E-06	1.29E-04	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71231_c0_g2_i1	3.80	5.13E-17	5.34E-15	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN66508_c1_g1_i2	4.09	2.50E-25	6.35E-23	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN70128_c0_g1_i6	4.15	3.03E-05	3.52E-04	TENA	HUMAN
0.25/Control	TRINITY_DN58364_c0_g1_i8	4.24	1.08E-04	1.04E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN47119_c0_g1_i1	4.31	6.17E-06	8.82E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN59968_c0_g1_i4	4.32	8.81E-33	3.83E-30	HSP71	ANOAL
0.25/Control	TRINITY_DN83319_c1_g1_i10	4.36	1.42E-31	5.54E-29	HSP70	ONCVO
0.25/Control	TRINITY_DN58249_c1_g1_i4	4.38	2.01E-04	1.77E-03	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN57644_c0_g1_i2	4.52	2.13E-30	7.75E-28	HSP70	CHICK
0.25/Control	TRINITY_DN56942_c0_g4_i1	4.54	5.84E-06	8.43E-05	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN56407_c0_g1_i4	4.66	5.94E-10	2.02E-08	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN71438_c0_g1_i4	4.85	3.51E-08	8.31E-07	N/A	N/A
0.25/Control	TRINITY_DN77031_c2_g1_i7	5.94	3.75E-41	2.73E-38	MMP19	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN63468_c5_g1_i2	7.20	1.12E-05	1.49E-04	SMUG1	MOUSE
0.25/Control	TRINITY_DN63686_c2_g2_i1	7.57	1.89E-05	2.34E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN80566_c0_g1_i2	-7.26	4.07E-14	2.85E-12	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN68272_c3_g2_i2	-5.13	4.79E-76	3.61E-72	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN79715_c0_g1_i1	-5.04	3.25E-14	2.31E-12	ACTC	BRAFL
2.5/Control	TRINITY_DN65632_c5_g3_i1	-4.50	2.79E-36	1.54E-33	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN61104_c0_g1_i27	-4.41	1.43E-03	8.95E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN64957_c2_g1_i2	-4.12	1.83E-08	4.69E-07	CEL	BOVIN
2.5/Control	TRINITY_DN65990_c0_g1_i3	-3.95	4.19E-21	6.91E-19	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN71660_c1_g1_i12	-3.61	2.18E-44	1.97E-41	USP1	PINMG
2.5/Control	TRINITY_DN58072_c0_g1_i1	-3.60	2.07E-39	1.38E-36	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN60801_c0_g1_i2	-3.59	6.71E-15	5.26E-13	ST1C4	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN63895_c0_g1_i7	-3.58	3.43E-06	5.23E-05	C356	FUNHE
2.5/Control	TRINITY_DN69887_c0_g1_i6	-3.54	4.20E-05	4.65E-04	GDAP1	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN65264_c0_g1_i8	-3.48	3.93E-05	4.39E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN61385_c3_g2_i5	-3.38	2.68E-11	1.18E-09	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN83828_c0_g2_i5	-3.13	4.13E-41	2.92E-38	MYD88	RAT
2.5/Control	TRINITY_DN66911_c0_g1_i13	-3.09	5.79E-05	6.16E-04	IOD1	FUNHE
2.5/Control	TRINITY_DN46990_c0_g1_i1	-3.00	4.09E-19	5.70E-17	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN68364_c0_g5_i1	-2.94	4.46E-08	1.04E-06	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN61536_c0_g1_i1	-2.92	2.27E-24	5.33E-22	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN72154_c0_g2_i9	-2.88	2.50E-05	2.97E-04	BIRC2	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN80924_c1_g1_i11	-2.84	6.67E-05	6.97E-04	CP2C8	HUMAN

2.5/Control	TRINITY_DN65545_c0_g1_i1	-2.83	8.16E-20	1.23E-17	NAS34	CAEEL
2.5/Control	TRINITY_DN53310_c0_g1_i3	-2.83	1.68E-08	4.32E-07	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN71462_c0_g1_i1	-2.82	2.02E-36	1.17E-33	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN76194_c0_g3_i3	-2.54	3.01E-04	2.48E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN81368_c0_g2_i3	-2.53	2.70E-07	5.36E-06	BIRC1	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN75297_c0_g4_i3	-2.48	9.53E-07	1.66E-05	DHRSX	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN71462_c0_g3_i1	-2.47	4.88E-38	2.98E-35	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN74584_c0_g1_i6	-2.46	1.53E-05	1.95E-04	CCD73	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN75684_c2_g1_i6	-2.39	9.40E-43	7.87E-40	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN66151_c6_g1_i9	-2.35	1.37E-11	6.30E-10	CP17A	SQUAC
2.5/Control	TRINITY_DN80566_c1_g2_i1	-2.34	2.09E-26	5.96E-24	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN85433_c3_g1_i1	-2.34	8.20E-04	5.66E-03	UD2C1	RABIT
2.5/Control	TRINITY_DN75515_c0_g1_i3	-2.33	3.80E-09	1.12E-07	BIR7A	XENLA
2.5/Control	TRINITY_DN56148_c0_g1_i1	-2.32	1.17E-05	1.54E-04	GST1	ONCVO
2.5/Control	TRINITY_DN80566_c1_g3_i4	-2.29	1.86E-19	2.68E-17	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN77031_c2_g1_i7	-2.28	3.75E-41	2.73E-38	MMP19	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN58609_c0_g1_i1	-2.28	1.10E-22	2.21E-20	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN66026_c3_g2_i2	-2.24	6.14E-08	1.39E-06	MDR1	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN68447_c0_g2_i3	-2.24	1.53E-03	9.43E-03	HTAI2	GORGO
2.5/Control	TRINITY_DN65670_c7_g1_i6	-2.19	1.32E-04	1.23E-03	NMAH	SCHPO
2.5/Control	TRINITY_DN84758_c2_g1_i14	-2.18	2.26E-07	4.56E-06	CP1A1	MICTO
2.5/Control	TRINITY_DN65228_c1_g3_i1	-2.16	8.60E-04	5.87E-03	ST1A1	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN85433_c3_g2_i2	-2.13	3.35E-04	2.72E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN80924_c0_g2_i1	-2.12	1.71E-04	1.54E-03	CP2DB	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN62031_c0_g2_i2	-2.12	1.74E-05	2.18E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN80924_c0_g1_i1	-2.11	6.04E-05	6.37E-04	CP2J6	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN80771_c1_g1_i1	-2.08	3.21E-05	3.69E-04	FBLN2	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN80771_c0_g1_i2	-2.07	2.57E-17	2.85E-15	MATN2	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN78076_c3_g1_i1	-2.06	1.50E-08	3.90E-07	AK1BA	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN58543_c11_g2_i2	-2.05	1.43E-04	1.32E-03	PHM	DROME
2.5/Control	TRINITY_DN61297_c0_g1_i3	-2.04	1.74E-04	1.57E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN81879_c7_g1_i3	-2.04	3.04E-13	1.92E-11	CP1A1	ORYLA
2.5/Control	TRINITY_DN78351_c0_g2_i2	2.00	3.70E-23	7.68E-21	ORCT	DROME
2.5/Control	TRINITY_DN72619_c4_g3_i2	2.01	1.95E-09	6.09E-08	PGBM	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN70965_c0_g1_i8	2.04	2.17E-04	1.88E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN78611_c0_g1_i2	2.05	9.80E-05	9.57E-04	CML12	ORYSJ
2.5/Control	TRINITY_DN88227_c12_g2_i1	2.05	7.26E-05	7.48E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN76804_c2_g1_i1	2.07	3.98E-07	7.59E-06	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN85133_c1_g1_i4	2.09	2.11E-15	1.77E-13	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN85062_c1_g2_i16	2.11	5.87E-08	1.33E-06	ORCT	DROME
2.5/Control	TRINITY_DN66588_c0_g2_i1	2.11	1.44E-09	4.60E-08	SO4C1	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN87712_c7_g3_i2	2.12	8.86E-05	8.78E-04	PLMN	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN77484_c0_g2_i2	2.16	1.97E-09	6.14E-08	LHPL3	DANRE
2.5/Control	TRINITY_DN73390_c0_g1_i5	2.19	1.01E-08	2.74E-07	YFEX	ECOLI
2.5/Control	TRINITY_DN68535_c2_g3_i2	2.20	2.43E-08	6.04E-07	YOBN	BACSU

2.5/Control	TRINITY_DN87961_c3_g1_i1	2.22	2.32E-11	1.03E-09	GP158	BOVIN
2.5/Control	TRINITY_DN87712_c7_g2_i2	2.23	5.25E-04	3.93E-03	SPAN	STRPU
2.5/Control	TRINITY_DN78074_c1_g1_i2	2.24	4.35E-09	1.27E-07	LGR6	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN78580_c0_g1_i1	2.25	3.87E-05	4.34E-04	HIP	MYTED
2.5/Control	TRINITY_DN81796_c0_g1_i5	2.28	1.11E-03	7.27E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN50594_c0_g1_i1	2.28	1.89E-06	3.07E-05	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN55913_c0_g1_i1	2.29	6.84E-04	4.88E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN59153_c0_g1_i8	2.34	2.55E-06	4.05E-05	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN84167_c0_g1_i2	2.35	2.30E-06	3.68E-05	HYPDH	XENLA
2.5/Control	TRINITY_DN84937_c1_g2_i1	2.35	8.57E-12	4.14E-10	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN66937_c0_g2_i2	2.38	3.34E-04	2.71E-03	GIMA4	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN55093_c0_g1_i1	2.39	7.14E-04	5.06E-03	CELR3	RAT
2.5/Control	TRINITY_DN83937_c0_g1_i6	2.42	6.74E-05	7.03E-04	LIN41	XENTR
2.5/Control	TRINITY_DN73384_c2_g1_i3	2.42	2.89E-07	5.73E-06	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN87187_c3_g1_i1	2.43	8.68E-04	5.92E-03	MPL3	DICDI
2.5/Control	TRINITY_DN71156_c0_g1_i4	2.43	4.60E-10	1.61E-08	KAT3	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN66930_c2_g1_i4	2.44	1.59E-03	9.74E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN75178_c1_g2_i7	2.45	3.68E-04	2.92E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN56226_c0_g1_i1	2.46	8.89E-06	1.22E-04	GP157	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN61026_c4_g7_i5	2.52	7.53E-09	2.08E-07	ORCT	DROME
2.5/Control	TRINITY_DN81859_c4_g2_i5	2.53	2.04E-06	3.30E-05	HEM3	BOVIN
2.5/Control	TRINITY_DN70458_c2_g4_i2	2.54	2.27E-05	2.74E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN63876_c4_g2_i1	2.58	1.74E-12	9.68E-11	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN59448_c0_g2_i5	2.60	1.59E-05	2.01E-04	XXLT1	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN62806_c0_g1_i8	2.61	2.97E-08	7.27E-07	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN32194_c0_g1_i1	2.65	6.01E-05	6.35E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN63980_c0_g2_i2	2.71	1.98E-07	4.03E-06	S22AL	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN70458_c2_g3_i1	2.72	4.74E-05	5.16E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN82133_c6_g1_i1	2.76	1.04E-03	6.91E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN58545_c0_g1_i2	2.80	4.58E-04	3.51E-03	SEC4	CANGA
2.5/Control	TRINITY_DN65159_c2_g1_i1	2.81	1.98E-04	1.75E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN59252_c0_g1_i1	2.93	2.55E-06	4.05E-05	LPH	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN62844_c4_g1_i2	2.96	5.03E-10	1.75E-08	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN59775_c1_g1_i5	3.00	4.91E-04	3.72E-03	PLMN	MACEU
2.5/Control	TRINITY_DN69676_c8_g2_i4	3.02	7.93E-04	5.51E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN67540_c4_g1_i1	3.02	3.51E-04	2.82E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN84836_c0_g2_i4	3.08	4.14E-05	4.58E-04	LPH	RABIT
2.5/Control	TRINITY_DN64504_c6_g1_i6	3.22	5.20E-05	5.59E-04	MOT12	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN65030_c0_g1_i1	3.24	9.80E-05	9.57E-04	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN61402_c2_g2_i4	3.27	1.13E-07	2.41E-06	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN79115_c0_g1_i3	3.38	1.31E-04	1.23E-03	LPH	HUMAN
2.5/Control	TRINITY_DN76351_c5_g3_i3	3.42	1.12E-03	7.33E-03	N/A	N/A
2.5/Control	TRINITY_DN67891_c1_g5_i9	3.43	3.18E-09	9.51E-08	GXLT1	MOUSE
2.5/Control	TRINITY_DN68308_c2_g1_i9	4.07	3.81E-05	4.26E-04	PRP1	SALTY
2.5/Control	TRINITY_DN63468_c5_g1_i2	4.55	1.12E-05	1.49E-04	SMUG1	MOUSE

2.5/Control	TRINITY_DN63686_c2_g2_i1	5.43	1.89E-05	2.34E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN80566_c0_g1_i2	-7.33	4.07E-14	2.85E-12	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN79715_c0_g1_i1	-6.04	3.25E-14	2.31E-12	ACTC	BRAFL
25/Control	TRINITY_DN76947_c0_g3_i7	-5.76	5.79E-04	4.25E-03	TIGD4	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN64957_c2_g1_i2	-4.55	1.83E-08	4.69E-07	CEL	BOVIN
25/Control	TRINITY_DN65990_c0_g1_i3	-4.42	4.19E-21	6.91E-19	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN65632_c5_g3_i1	-4.01	2.79E-36	1.54E-33	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN46990_c0_g1_i1	-3.93	4.09E-19	5.70E-17	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN68272_c3_g2_i2	-3.85	4.79E-76	3.61E-72	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN58072_c0_g1_i1	-3.58	2.07E-39	1.38E-36	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN85433_c3_g1_i1	-3.44	8.20E-04	5.66E-03	UD2C1	RABIT
25/Control	TRINITY_DN60801_c0_g1_i2	-3.40	6.71E-15	5.26E-13	ST1C4	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN80924_c1_g1_i11	-3.39	6.67E-05	6.97E-04	CP2C8	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN61536_c0_g1_i1	-3.36	2.27E-24	5.33E-22	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN50370_c0_g1_i4	-3.32	4.43E-04	3.42E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN71420_c0_g3_i1	-3.05	2.04E-04	1.79E-03	RTBS	DROME
25/Control	TRINITY_DN74584_c0_g1_i6	-2.99	1.53E-05	1.95E-04	CCD73	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN75684_c2_g1_i6	-2.98	9.40E-43	7.87E-40	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN71660_c1_g1_i12	-2.87	2.18E-44	1.97E-41	USP1	PINMG
25/Control	TRINITY_DN71462_c0_g1_i1	-2.81	2.02E-36	1.17E-33	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN80924_c0_g2_i1	-2.77	1.71E-04	1.54E-03	CP2DB	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN85433_c3_g2_i2	-2.76	3.35E-04	2.72E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN80566_c1_g2_i1	-2.73	2.09E-26	5.96E-24	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN66026_c3_g2_i2	-2.69	6.14E-08	1.39E-06	MDR1	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN68364_c0_g5_i1	-2.66	4.46E-08	1.04E-06	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN61385_c3_g2_i5	-2.60	2.68E-11	1.18E-09	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN83828_c0_g2_i5	-2.49	4.13E-41	2.92E-38	MYD88	RAT
25/Control	TRINITY_DN68447_c0_g2_i3	-2.44	1.53E-03	9.43E-03	HTAI2	GORGO
25/Control	TRINITY_DN63916_c0_g1_i2	-2.43	6.60E-04	4.74E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN72578_c0_g1_i1	-2.42	1.42E-03	8.90E-03	DPEP1	RABIT
25/Control	TRINITY_DN58543_c11_g2_i2	-2.42	1.43E-04	1.32E-03	PHM	DROME
25/Control	TRINITY_DN71462_c0_g3_i1	-2.34	4.88E-38	2.98E-35	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN85086_c2_g1_i2	-2.32	8.11E-05	8.18E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN76194_c0_g3_i3	-2.23	3.01E-04	2.48E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN56148_c0_g1_i1	-2.20	1.17E-05	1.54E-04	GST1	ONCVO
25/Control	TRINITY_DN65066_c3_g2_i1	-2.18	8.81E-04	6.00E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN80924_c1_g3_i1	-2.16	2.29E-05	2.76E-04	CP2CN	RAT
25/Control	TRINITY_DN87640_c2_g1_i1	-2.14	3.53E-09	1.05E-07	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN70684_c5_g13_i1	-2.14	1.41E-08	3.71E-07	MOS1T	DROMA
25/Control	TRINITY_DN56033_c0_g1_i1	-2.13	2.33E-13	1.49E-11	IL17L	CRAGI
25/Control	TRINITY_DN63895_c0_g1_i7	-2.12	3.43E-06	5.23E-05	C356	FUNHE
25/Control	TRINITY_DN68724_c1_g1_i2	-2.05	1.65E-68	9.33E-65	ANK3	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN75844_c0_g1_i2	-2.04	1.44E-04	1.32E-03	TYRO	PINMA
25/Control	TRINITY_DN82515_c0_g1_i10	-2.04	4.55E-20	6.95E-18	AOX	EMENI
25/Control	TRINITY_DN77649_c3_g1_i1	-2.04	5.80E-05	6.17E-04	GDAP1	HUMAN

25/Control	TRINITY_DN77379_c0_g1_i2	-2.01	3.18E-06	4.90E-05	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN62806_c0_g1_i8	2.00	2.97E-08	7.27E-07	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN78351_c0_g2_i2	2.01	3.70E-23	7.68E-21	ORCT	DROME
25/Control	TRINITY_DN79115_c0_g1_i3	2.03	1.31E-04	1.23E-03	LPH	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN59153_c0_g1_i8	2.03	2.55E-06	4.05E-05	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN59906_c0_g1_i3	2.07	2.36E-05	2.83E-04	CAH14	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN64504_c6_g1_i6	2.10	5.20E-05	5.59E-04	MOT12	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN128055_c0_g1_i1	2.12	3.50E-06	5.34E-05	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN65550_c4_g3_i4	2.12	7.47E-04	5.25E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN83526_c2_g3_i2	2.14	4.73E-11	2.00E-09	EAA1	BOVIN
25/Control	TRINITY_DN59551_c0_g1_i1	2.14	1.57E-03	9.66E-03	C1QL4	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN71567_c0_g1_i2	2.15	2.45E-19	3.50E-17	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN74546_c0_g4_i2	2.15	7.14E-06	1.00E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN77484_c0_g2_i2	2.16	1.97E-09	6.14E-08	LHPL3	DANRE
25/Control	TRINITY_DN84370_c5_g1_i16	2.17	1.21E-12	7.02E-11	GP158	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN72961_c0_g1_i3	2.19	1.52E-05	1.94E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN58013_c0_g1_i1	2.21	1.13E-03	7.39E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN21158_c0_g1_i1	2.23	9.53E-06	1.29E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN63769_c0_g1_i2	2.24	7.10E-04	5.04E-03	EST5A	CANLF
25/Control	TRINITY_DN78611_c0_g1_i2	2.27	9.80E-05	9.57E-04	CML12	ORYSJ
25/Control	TRINITY_DN60528_c0_g3_i2	2.28	9.28E-04	6.26E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN78580_c0_g2_i1	2.32	1.25E-03	8.01E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN55913_c0_g1_i1	2.34	6.84E-04	4.88E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN62249_c2_g2_i1	2.34	3.17E-04	2.59E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN65330_c0_g1_i8	2.34	1.20E-03	7.77E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN62269_c0_g1_i4	2.34	1.84E-09	5.77E-08	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN70128_c0_g1_i6	2.37	3.03E-05	3.52E-04	TENA	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN78580_c0_g1_i1	2.37	3.87E-05	4.34E-04	HIP	MYTED
25/Control	TRINITY_DN59448_c0_g2_i5	2.42	1.59E-05	2.01E-04	XXLT1	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN63980_c0_g2_i2	2.42	1.98E-07	4.03E-06	S22AL	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN60089_c0_g2_i1	2.47	1.38E-03	8.65E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN67282_c0_g2_i1	2.48	7.77E-06	1.08E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN58584_c0_g1_i2	2.53	1.76E-10	6.72E-09	EAA4	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN73390_c0_g1_i5	2.55	1.01E-08	2.74E-07	YFEX	ECOLI
25/Control	TRINITY_DN55093_c0_g1_i1	2.55	7.14E-04	5.06E-03	CELR3	RAT
25/Control	TRINITY_DN61026_c4_g7_i5	2.59	7.53E-09	2.08E-07	ORCT	DROME
25/Control	TRINITY_DN76351_c5_g3_i3	2.61	1.12E-03	7.33E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN81859_c4_g2_i5	2.63	2.04E-06	3.30E-05	HEM3	BOVIN
25/Control	TRINITY_DN77646_c1_g1_i1	2.64	6.50E-09	1.81E-07	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN42525_c0_g1_i1	2.72	1.85E-05	2.29E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN87712_c7_g3_i2	2.75	8.86E-05	8.78E-04	PLMN	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN75178_c1_g2_i7	2.83	3.68E-04	2.92E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN84167_c0_g1_i2	2.83	2.30E-06	3.68E-05	HYPDH	XENLA
25/Control	TRINITY_DN70775_c0_g1_i3	2.86	1.17E-04	1.12E-03	FAT3	MOUSE
25/Control	TRINITY_DN61758_c1_g1_i6	2.88	1.37E-03	8.60E-03	CAS4	EPHMU

25/Control	TRINITY_DN74652_c2_g1_i3	2.90	7.60E-05	7.77E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN68898_c3_g1_i3	2.91	1.53E-05	1.95E-04	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN68308_c2_g1_i9	2.96	3.81E-05	4.26E-04	PRP1	SALTY
25/Control	TRINITY_DN78710_c0_g1_i4	3.16	2.47E-07	4.94E-06	CEMIP	HUMAN
25/Control	TRINITY_DN73510_c5_g1_i1	3.27	3.68E-07	7.08E-06	M130	STRPU
25/Control	TRINITY_DN73462_c3_g2_i7	3.67	5.31E-04	3.96E-03	N/A	N/A
25/Control	TRINITY_DN63686_c2_g2_i1	3.75	1.89E-05	2.34E-04	N/A	N/A

Table S4. Gene Ontology enrichment based on DEGs highlighted in the 0.25 µg L^{-1} treatment after semantic-based clustering in REVIGO.

Term ID	GO name	log_{10}(*p*-value)	DEGs number
GO:0016491	oxidoreductase activity	-13.24	36
GO:0008395	steroid hydroxylase activity	-7.46	8
GO:0005506	iron ion binding	-7.26	13
GO:1901685	glutathione derivative metabolic process	-7.07	4
GO:1901687	glutathione derivative biosynthetic process	-7.07	4
GO:0014809	regulation of skeletal muscle contraction by regulation of release of sequestered calcium ion	-6.68	3
GO:0030613	oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors	-6.68	3
GO:0030614	oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors, disulfide as acceptor	-6.68	3
GO:0004497	monooxygenase activity	-6.03	11
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	-5.98	12
GO:0044281	small molecule metabolic process	-5.81	30
GO:0015038	glutathione disulfide oxidoreductase activity	-5.68	3
GO:0020037	heme binding	-5.54	11
GO:0009407	toxin catabolic process	-5.39	3
GO:0019852	L-ascorbic acid metabolic process	-5.17	4
GO:0006766	vitamin metabolic process	-5.16	7
GO:0071243	cellular response to arsenic-containing substance	-5.14	3
GO:0004089	carbonate dehydratase activity	-5.08	4
GO:0046906	tetrapyrrole binding	-5.05	11
GO:0016614	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	-5.04	10
GO:0019748	secondary metabolic process	-4.99	7
GO:0048037	cofactor binding	-4.93	18
GO:0004364	glutathione transferase activity	-4.71	5
GO:0035722	interleukin-12-mediated signaling pathway	-4.48	3
GO:0033559	unsaturated fatty acid metabolic process	-4.45	6
GO:0042221	response to chemical	-4.20	27
GO:0008392	arachidonic acid epoxygenase activity	-4.07	4
GO:0006820	anion transport	-3.99	12
GO:0008391	arachidonic acid monooxygenase activity	-3.98	4
GO:0048878	chemical homeostasis	-3.94	14
GO:0006790	sulfur compound metabolic process	-3.94	10
GO:0003676	nucleic acid binding	-3.88	6
GO:0044706	multi-multicellular organism process	-3.77	5
GO:0098739	import across plasma membrane	-3.77	5

GO:1901568	fatty acid derivative metabolic process	-3.74	6
GO:0016765	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	-3.70	5
GO:0044425	membrane part	-3.67	61
GO:0003824	catalytic activity	-3.64	74
GO:0006629	lipid metabolic process	-3.63	18
GO:0006749	glutathione metabolic process	-3.61	4
GO:0009719	response to endogenous stimulus	-3.54	13
GO:0015701	bicarbonate transport	-3.53	3
GO:0008202	steroid metabolic process	-3.48	8
GO:0043170	macromolecule metabolic process	-3.43	19
GO:0006811	ion transport	-3.41	17
GO:0046685	response to arsenic-containing substance	-3.36	3
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	-3.13	3
GO:0006066	alcohol metabolic process	-3.11	8
GO:0044432	endoplasmic reticulum part	-3.05	16
GO:0016829	lyase activity	-2.91	7
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	-2.89	11
GO:0016616	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	-2.89	6
GO:0046914	transition metal ion binding	-2.85	21
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	-2.79	6
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	-2.77	8
GO:0008645	hexose transmembrane transport	-2.76	3
GO:0003674	Molecular function	-2.67	123
GO:0005215	transporter activity	-2.67	20
GO:0015149	hexose transmembrane transporter activity	-2.66	3
GO:0006694	steroid biosynthetic process	-2.54	4
GO:1901615	organic hydroxy compound metabolic process	-2.47	9
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	-2.45	9
GO:0005902	microvillus	-2.36	3
GO:0005887	integral component of plasma membrane	-2.32	16
GO:0044282	small molecule catabolic process	-2.31	8
GO:0044459	plasma membrane part	-2.31	27
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	-2.30	6
GO:0002755	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	-2.25	3
GO:0071702	organic substance transport	-2.24	20
GO:0050660	flavin adenine dinucleotide binding	-2.21	5
GO:0016209	antioxidant activity	-2.19	4
GO:0050896	response to stimulus	-2.19	37
GO:0016667	oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors	-2.15	3
GO:0006732	coenzyme metabolic process	-2.06	6
GO:0042476	odontogenesis	-2.05	3
GO:0051186	cofactor metabolic process	-2.05	8
GO:0034035	purine ribonucleoside bisphosphate metabolic process	-2.02	3

Table S5. Gene Ontology enrichment based on DEGs highlighted in the 2.5 µg L^{-1} treatment after semantic-based clustering in REVIGO.

Term ID	GO name	log_{10}(*p*-value)	DEGs number
GO:0000016	lactase activity	-7.71	3
GO:0017042	glycosylceramidase activity	-7.71	3
GO:0004497	monooxygenase activity	-6.02	8
GO:0016712	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	-5.89	6
GO:0020037	heme binding	-5.65	8
GO:0016491	oxidoreductase activity	-5.40	15
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	-5.36	8
GO:0046906	tetrapyrrole binding	-5.27	8
GO:0003824	catalytic activity	-5.02	43
GO:0005506	iron ion binding	-4.62	7
GO:0046914	transition metal ion binding	-3.81	14
GO:0007586	digestion	-3.31	3
GO:0034310	primary alcohol catabolic process	-3.28	3
GO:0019369	arachidonic acid metabolic process	-3.22	3
GO:0048037	cofactor binding	-3.03	9
GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	-2.93	6
GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	-2.87	8
GO:0043028	cysteine-type endopeptidase regulator activity involved in apoptotic process	-2.78	3
GO:0016765	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	-2.72	3
GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	-2.64	3
GO:0044425	membrane part	-2.58	30
GO:0032991	macromolecular complex	-2.50	3
GO:0003674	molecular function	-2.44	61
GO:0010951	negative regulation of endopeptidase activity	-2.43	3
GO:0017001	antibiotic catabolic process	-2.41	3
GO:0012501	programmed cell death	-2.37	6
GO:0001764	neuron migration	-2.34	3
GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	-2.31	3
GO:0008219	cell death	-2.30	6
GO:0031099	regeneration	-2.21	3
GO:1901568	fatty acid derivative metabolic process	-2.20	3
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	-2.19	4
GO:0008202	steroid metabolic process	-2.11	4
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	-2.10	3
GO:0005515	protein binding	-2.06	5

Table S6. Gene Ontology enrichment based on DEGs highlighted in the 25 µg L^{-1} treatment after semantic-based clustering in REVIGO.

Term ID	GO name	log_{10}(*p*-value)	DEGs number
GO:0016712	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	-3.66	4

GO:0019369	arachidonic acid metabolic process	-3.42	3
GO:0004497	monooxygenase activity	-3.32	5
GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	-3.29	6
GO:0015238	drug transmembrane transporter activity	-3.10	4
GO:0020037	heme binding	-3.09	5
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	-2.92	5
GO:0016765	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	-2.92	3
GO:0016491	oxidoreductase activity	-2.92	10
GO:0034767	positive regulation of ion transmembrane transport	-2.90	3
GO:0046906	tetrapyrrole binding	-2.86	5
GO:0003333	amino acid transmembrane transport	-2.72	3
GO:0043436	oxoacid metabolic process	-2.46	8
GO:1901568	fatty acid derivative metabolic process	-2.38	3
GO:0044425	membrane part	-2.34	26
GO:0006855	drug transmembrane transport	-2.26	3
GO:0005506	iron ion binding	-2.21	4

Bacterial charges in tank systems: a metabarcoding approach

Material and methods

Experimental design and metabarcoding analysis. Identical doses and protocols were used to those of Gardon *et al.* (2018), with the seawater used for the recreated algae/micro-PS mixture filtered at 25 and 5 µm before being put in tanks. No pearl oysters were used in this additional experiment. For bacterial community assessment, we adapted the protocol described in Hildebrandt *et al.* (2019) to sample microplastic from water bodies. We sampled 50 ml of water from each tank in duplicate at T0 and at T24. We assessed particle size and abundance using a counter-coulter machine (MultisizerTM, (Coulter, 2000). The water samples were centrifuged for 20 minutes at 5000 *g* to specifically assess bacterial communities on the mix of algae and microplastic beads. We added TRIZOL, following the manufacturer's recommended ratio and the samples were stocked at -20°C for later analysis. DNA extraction included a first step of homogenization by vortexing (10 min at 30 beats s^{-1}) in TRIZOL followed by a centrifugation step (12,000 *g* for 10 min at 4°C). Phase separation was achieved by adding 200 µl chloroform and centrifuging for 12 min at 12,000 *g* and 4°C. We removed the supernatant containing the RNA and kept the pellet containing the DNA. A volume of 450 µl of absolute ethanol was added and the tubes were centrifuged for 5 min at 10,000 *g* and 4°C. After removing the supernatant, we washed the DNA three times in 0.1 M sodium citrate followed by centrifuging for 5 min at 10,000 *g* and ambient temperature. We removed DNA salts by adding 1.5 mL 75% ethanol and centrifuging for 5 min at 10,000 *g* and ambient temperature. The supernatant was removed directly by spilling. The "speed vac" was used to dry the samples before adding 100 µl of

nuclease-free water for pellet resuspension. DNA quantity and quality were assessed using a Nanodrop (NanoDrop Technologies Inc., USA) and a 2100 BioAnalyzer System (Agilent Technologies, USA). Total bacterial load was assessed by quantitative PCR (q-PCR), with amplification of the V3 region of the 16S SSu rRNA from the bacterial domain (w49dir: 5'-CGGTCCAGACTCCTACGGG -3'; w34rev: 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'; Lee *et al.*, 1996; Christman *et al.*, 2011) using SYBR Green II (Jin *et al.*, 1994). Quantification was performed on a Mx3000P v4.10 QPCR system (Agilent, 2015). The primer concentrations were 0.2 µM and the following cycling times were used: 95°C for 10 min, 40 x [denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 60 s] followed by a final step at 72°C for 20 min. DNA samples were dried in DNA-stable solution (ThermoFisher Scientific, USA) and sent to the McGill sequencing platform services (Montreal, Canada) for metabarcoding analysis. DNA libraries were prepared by amplifying the V4 region of the 16S SSU rRNA (16S_515F: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'; 16S_806rb: 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') and multiplexed on a half-lane of a MiSeq 250-bp paired-end (PE) platform.

Reads quality was assessed before and after trimming with FastQC v0.11.8 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) and MultiQC v1.6 (Ewels *et al.*, 2016). We used the DADA2 algorithm (Callahan *et al.*, 2016) implemented in QIIME v2.0.0 (https://qiime2.org) to cluster amplicon sequence variants (AS*Vs*). We used the GreenGenes 13.8 (99%) database (DeSantis *et al.*, 2006) to infer ASV taxonomy. Statistical analyses and representation were conducted with the *Phyloseq* v1.26.1 (McMurdie and Holmes, 2013) and *Vegan* v2.5-5 R packages (Oksanen *et al.*, 2008).

Results

We observed large variation in the total bacterial concentration in the algae tanks (assessed by q-PCR) across the duplicate experiments (Figure S2) and no significant differences among treatments (Kruskal-Wallis; df = 7; $P = 0.2058$). Our hypothesis that micro-PS could serve as vectors for specific bacteria of biofilms was also not verified in our experiment. Indeed, bacterial composition, assessed by the specific abundance of operational taxonomic units (OTUs) was not affected significantly by treatment (micro-PS *vs* control; RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 0.34; $P = 0.93$; Fig. S3). Significant differences in bacterial communities, according to OTU abundance values, were only observed with time (T0 and T24; RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 15.98; $P < 0.001$) and among duplicate experiments (experiments 1, 2 and 3; RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 13.31; $P < 0.001$). Similarly, unweighted UniFrac values showed significant differences across each experiment (Permanova; 1000 permutations, q-value < 0.01), but not between treatments (Permanova; 1000 permutations; q-value > 0.05; Table S6). Cyanobacteria, Bacteriodetes and Proteobacteria were the most highly represented phyla in our

samplings (Figure S4). *Flavobacteriaceae* was the most highly represented family in our T0 samples. After 24 h, we observed the same bacterial community variation among treatments (Control and MP): *Alteromonadaceae*, and *Saprospiraceae* and were the most highly represented families in our tanks. We identified some OTUs to the genus level in these families, including *Saprospira* (f. *Saprospiraceae*), *Muricauda* and *Winogradskyella* (f. *Flavobacteriaceae*), *Bacteriovorax* (f. *Bacteriovoraceae*) and, finally, *Alteromonas*, *Glaciecola*, and *Marinobacter* (f. *Alteromonadaceae*).

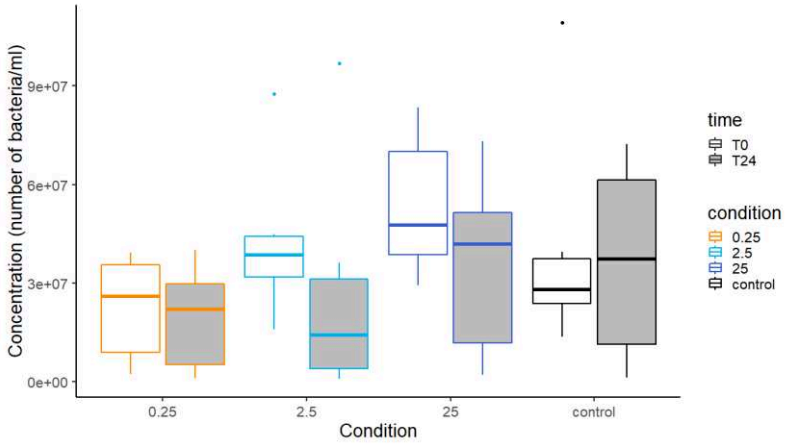


Figure S2. Boxplot of total bacterial quantity expressed in number of bacteria ml^{-1} in the different treatments (control, 0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1}), following the samplings at T0 and T24 (Kruskal-Wallis; df = 7; P = 0.2058). Quantified by q-PCR.

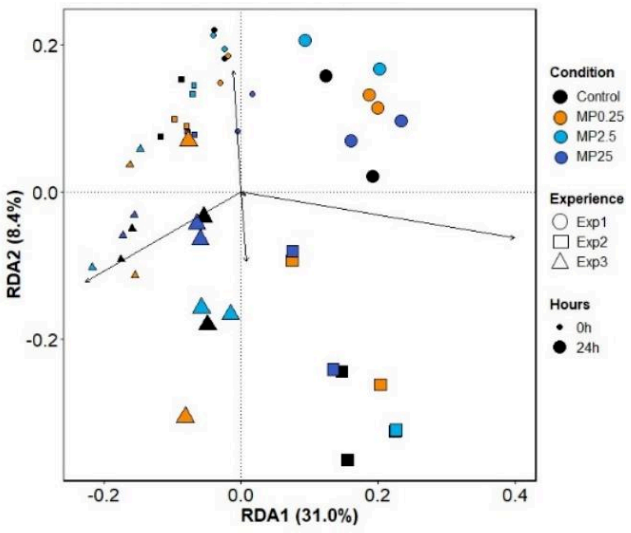


Figure S3. Relative OTU representation among variables (treatment, time, experiment) (R^2 = 0.37; P < 0.001). Significant differences in the bacterial community were only assessed between time points (T0 and T24; RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 15.98; P < 0.001) and among duplicate experiments (Experiments 1, 2 and 3; RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 13.31; P < 0.001).

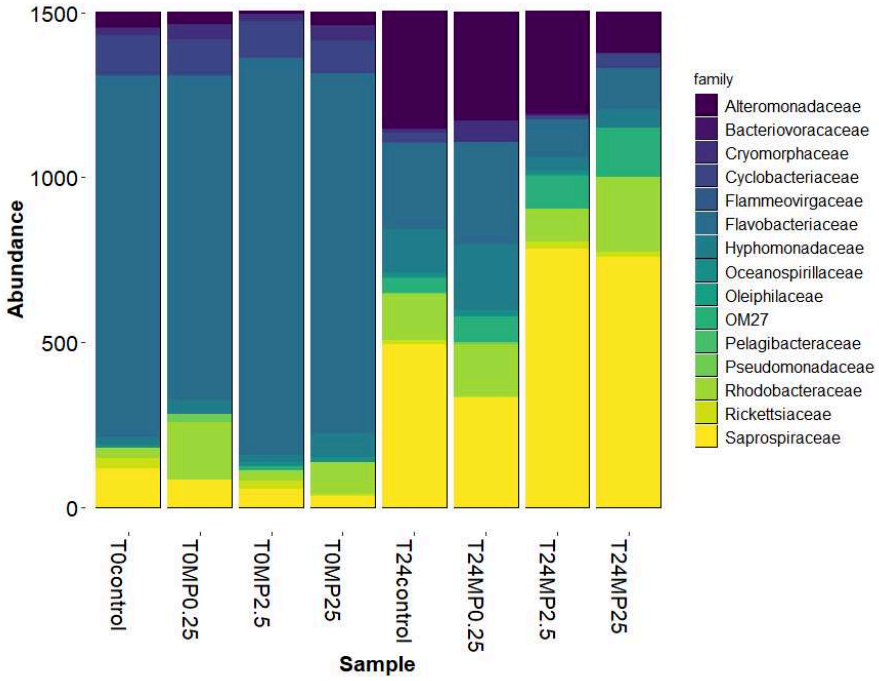


Figure S4. Metabarcoding taxonomic results on families at T0 and T24 among treatments and time. Bacterial composition was significantly affected by time (RDA; ANOVA; 1000 permutations; F = 15.98, *P* < 0.001) but not by treatment.

Table S7. Statistical analysis of the treatment effects on the unweighted UniFrac values. The values in Group 1 and Group 2 represent microplastic conditions.

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	*P*-value	q-value
0.25	2.5	24	999	0.17	0.993	1
0.25	25	24	999	0.48	0.804	1
0.25	Control	24	999	0.21	0.99	1
2.5	25	24	999	0.55	0.793	1
2.5	Control	24	999	0.02	1	1
25	Control	24	999	0.51	0.823	1

4. Conclusion et perspectives

Cette première expérimentation en laboratoire a permis de s'approprier la méthodologie d'exposition des huîtres perlières aux MP. Les résultats physiologiques ont révélé une diminution de l'efficacité d'assimilation des huîtres exposées qui s'est répercutée de manière significative et dose-dépendante sur le bilan énergétique des animaux. Un bilan énergétique négatif a même été mesuré chez les huîtres exposées à 25 $\mu g.L^{-1}$ témoignant d'un déficit énergétique fort. L'analyse histologique des gonades a révélé une gamétogénèse anormale chez certains individus exposés avec des zones de régression suspectées et des stades de régression avancée. Cette partie de l'étude a montré l'impact des micro-PS sur l'incapacité des huîtres perlières à conserver le même rythme d'acquisition de l'énergie et des conséquences au niveau de la reproduction qui se manifestent par des infiltrations hémocytaires, l'arrêt de la prolifération goniale et la régression des gonades. Au niveau moléculaire, l'analyse des données transcriptomiques a permis d'identifier près de 359 gènes différentiellement exprimés (DEG) entre les huîtres exposées aux micro-PS et les huîtres témoins. Aucun DEG impliqué dans des fonctions de biominéralisation n'a été observé. En revanche, l'expression de gènes impliqués dans des processus de détoxification ont été affectés par cette exposition *via* une diminution des réponses antioxydantes, entraînant vraisemblablement un stress et des dommages oxydatifs (liés au ROS), en particulier aux deux doses plus élevées (2,5 et 25 $\mu g.L^{-1}$). Une réponse immunitaire est également apparue dose-spécifique avec une réponse au stress marquée par le différentiel d'expression des cascades/mécanismes TLR (Toll Like Receptors) / MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) stimulée à la dose la plus faible (0,25 $\mu g.L^{-1}$). Cette réponse au stress n'a pas été observée chez les individus exposés aux doses élevées (plus affaiblis énergétiquement), reflétant ainsi une capacité énergétique limitée des huîtres perlières à faire face au stress prolongé dans ces conditions. Ces résultats concordent avec les résultats physiologiques précédents caractérisés par une diminution dose-dépendante d'entrée d'énergie. Dans l'ensemble, ces données physiologiques ainsi que les gènes candidats identifiés dans ces différentes cascades moléculaires constituent la base des effets induits par les MP sur l'huître perlière. Cette base sert de point de comparaison pour l'expérimentation suivante visant à tester une exposition plus réaliste avec des MP produits à partir de structures perlicoles collectées *in situ*. En effet, les concentrations et la nature des MP (*i.e.* tailles, formes, types de polymère, propriétés de surface et composition chimique variables) peuvent avoir un rôle dans la réponse d'un individu au stress MP impliquant à la fois des effets physiques et chimiques.

CHAPITRE V

IMPACT DES MICROPLASTIQUES PRODUITS À PARTIR DE STRUCTURES PERLICOLES SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE

CHAPITRE V : IMPACT DES MICROPLASTIQUES PRODUITS À PARTIR DE STRUCTURES PERLICOLES SUR L'HUÎTRE PERLIÈRE

1. Préambule

Au cours des quinze dernières années, la communauté scientifique a consacré beaucoup d'attention à la menace MP en évaluant les concentrations environnementales dans différents compartiments du système marin (Eriksen *et al.*, 2013 ; Cózar *et al.*, 2014 ; Woodall *et al.*, 2014 ; van Sebille *et al.*, 2015) et les effets néfastes qu'ils peuvent occasionner sur des organismes (*e.g.* Browne *et al.*, 2008 ; von Moos *et al.*, 2012 ; Besseling *et al.*, 2014 ; Cole *et al.*, 2015a ; Sussarellu *et al.*, 2016). Cependant, la grande majorité des expérimentations conduites en laboratoire utilise, le plus souvent, des microbilles (et nanobilles) sphériques standardisées (comme ici dans le cadre de la première expérimentation, *Chapitre IV*) composées généralement d'un seul type de polymère, à des concentrations généralement plus élevées (en nombre de particules par volume) que celles enregistrées *in situ* (**Figure 37**) (Phuong *et al.*, 2016 ; Lenz *et al.*, 2016 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). En effet, pour la plupart, les concentrations testées sont basées sur des concentrations massiques qui se situent généralement dans une gamme haute de tailles de particules (*i.e.* > 335 µm) alors que les particules utilisées pour les tests sont bien inférieures en taille (**Figure 37**) (Lenz *et al.*, 2016 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). Ceci induit inévitablement un manque de pertinence écologique sachant que les conditions réelles d'exposition sont bien plus complexes (*i.e.* tailles, formes, types de polymère, propriétés de surface et composition chimique variables) (Phuong *et al.*, 2016 ; Lambert *et al.*, 2017) induisant des effets multiples et synergiques (*e.g.* effets physiques, toxicité chimique, (micro)biote associé, etc.) (Engler, 2012 ; Pittura *et al.*, 2018 ; Reisser *et al.*, 2014 ; Syberg *et al.*, 2015). À cela s'ajoute notre incapacité à pouvoir évaluer actuellement la contamination *in situ* en MNP < 10 µm (Schwaferts *et al.*, 2019), ce qui limite notre aptitude à reproduire les conditions réelles d'exposition en testant des concentrations massiques et numéraires similaires. Ainsi, les MNP doivent être considérés comme une menace globale qui exige beaucoup de données *in situ* avec un effort méthodologique vers les petites tailles pour une bonne évaluation des risques associés (Koelmans *et al.*, 2017 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). Malgré ce fossé qui sépare les conditions testées en laboratoire des conditions réelles d'exposition, le nombre d'articles scientifiques continue d'augmenter bien que les connaissances n'augmentent pas au même rythme en raison de leur redondance. De ce fait, l'écart entre les risques potentiels et les risques réels reste concret au regard du manque de pertinence écologique dans les expériences en laboratoire (Lenz *et al.*,

2016 ; Connors *et al.*, 2017 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). Pour ces raisons, il est essentiel de viser des expériences écotoxicologiques qui se rapprochent autant que possible d'une réalité environnementale afin que l'évaluation des risques associés aux MNP soit la plus robuste possible.

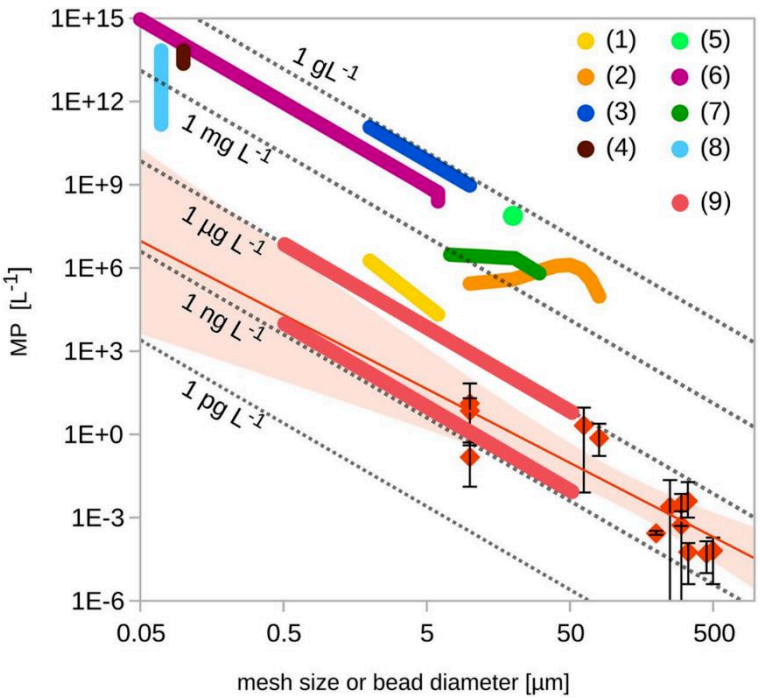


Figure 37. Comparaison entre les concentrations de microplastiques utilisées dans les études d'exposition (lignes de couleur en gras) et les concentrations environnementales mesurées (losanges rouges : concentrations moyennes, barres d'erreur : concentration minimale et maximale). La ligne rouge extrapole les données de terrain avec le meilleur ajustement en utilisant une régression de la loi de puissance (intervalles de confiance de 95% sous forme de zones rouge pâle). Les lignes en pointillés illustrent des concentrations massiques égales pour une densité de particules = 1,04 g.cm^{-3}. L'axe des x représente le diamètre des microbilles utilisées dans les expérimentations d'exposition et la taille des mailles utilisées dans les suivis environnementaux. (1) Sussarellu *et al.*, 2016 ; (2) von Moos *et al.*, 2012 ; (3) Browne *et al.*, 2008 ; (4) Besseling *et al.*, 2013 ; (5) Cole *et al.*, 2015 ; (6) Lee *et al.*, 2013 ; (7) Cole *et al.*, 2013 ; (8) Besseling *et al.*, 2014 ; (9) projections approximatives des concentrations massiques testées dans ce travail de thèse lors de l'exposition des huîtres perlières aux MNP perlicoles (0,4-60 µm) à 0,025 et 1 µg.L^{-1}. *Modifié d'après Lenz et al. (2016) – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS).*

Ainsi, bien qu'il soit difficile à l'heure actuelle de tester à la fois des concentrations massiques et numéraires réalistes, des études récentes ont mis en évidence l'intérêt de travailler avec des matières plastiques aussi proches que possible de celles retrouvées dans l'environnement naturel. Cette démarche constitue un premier pas vers la pertinence écologique. Ces travaux ont pu démontrer des caractéristiques bien différentes entre des matières plastiques vieillies/usées par le temps et neuves ou encore les plastiques vierges (*e.g.* billes standardisées) (Song *et al.*,

2017 ; Bandow *et al.*, 2017 ; Kedzierski *et al.*, 2018 ; G. Liu *et al.*, 2019). Par exemple, Liu *et al.* (2019) ont montré que le vieillissement peut affecter de manière significative les propriétés physico-chimiques des MP, et par conséquent, peut influencer leur devenir, leur transport et leurs effets.

Afin de tendre vers une démarche écologique plus pertinente et d'étudier l'impact de la contamination microplastique sur l'huître perlière, la première étape repose sur la sélection de matières plastiques pouvant représenter des sources potentielles de MP dans les lagons perlicoles où vit *P. margaritifera*. Bien que les sources de MP retrouvés dans les échantillons *in situ* doivent être déterminées, les travaux réalisés dans le cadre du *Chapitre III* (article 1) ont permis d'identifier les cordes et les collecteurs de naissains (*i.e.* ombrières de collectage) comme étant deux sources potentielles de MP de type PE et PP. Par ailleurs, comme développé précédemment dans le *Chapitre I* (section *6.2.2*), les débris plastiques peuvent agir comme vecteur de produits chimiques dangereux comme les additifs (Hermabessiere *et al.*, 2017) et/ou les polluants adsorbés dans le milieu naturel (*e.g.* POP, métaux traces) (Mato *et al.*, 2001 ; Teuten *et al.*, 2009 ; Paul-Pont *et al.*, 2016). Ces produits chimiques peuvent entraîner divers effets toxiques après avoir été transférés à l'organisme directement (après ingestion) et/ou indirectement (par lixiviation dans le milieu environnant). Par conséquent, il est important d'évaluer le potentiel de toxicité chimique des plastiques perlicoles avant d'évaluer l'impact des MP produits à partir de ces équipements sur *P. margaritifera*. Une approche toxicologique a donc été menée par le biais d'un « bioessai » impliquant des lixiviats de 24 et 120 h préparés à partir de cordes et de collecteurs neufs et usagés (*i.e.* collectés *in situ*). Des analyses chimiques, conduites en collaboration avec le Cedre, ont été réalisées à la fois sur les lixiviats mais aussi directement sur les structures perlicoles utilisées pour leur préparation. La toxicité des lixiviats a pu être évaluée sur les stades précoces (*i.e.* les plus sensibles) du développement (embryo-larvaire) de *P. margaritifera* par l'intermédiaire d'une relation dose-effet obtenue par dilutions successives des lixiviats. Les résultats de cette expérimentation ont révélé que les lixiviats étaient de véritables « cocktails » de contaminants chimiques notamment ceux issus des plastiques neufs à travers une désorption importante d'additifs. Les lixiviats issus des structures neuves se sont d'ailleurs avérés plus toxiques que ceux issus des structures usagées avec des effets observés même aux concentrations les plus faibles. Cette toxicité a été mise en évidence à travers une diminution du développement embryonnaire et une augmentation du taux de mortalité embryo-larvaire de *P. margaritifera*. Ce travail a fait l'objet d'une publication (article 4) dans la revue scientifique *Water Research* (facteur d'impact 2020 : 9.130) :

Water Research 179 (2020) 115890

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon [a, *], Arnaud Huvet [b, **], Ika Paul-Pont [b], Anne-Laure Cassone [b], Manaarii Sham Koua [a], Claude Soyez [a], Ronan Jezequel [c], Justine Receveur [c], Gilles Le Moullac [a]

[a] Ifremer, Institut Louis-Malardé, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France
[b] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France
[c] CEDRE – 715 Rue Alain Colas, 29218, BREST Cedex 2, France

Après avoir évalué le potentiel de toxicité chimique des cordes et des collecteurs de naissains, la démarche expérimentale visant à s'approcher d'une réalité environnementale lagonaire a reposé sur la production de MP à partir de ces structures. Par conséquent, un protocole innovant pour produire des MP à partir des structures perlicoles usagées a été mis en place. Néanmoins, la grande difficulté pour ce type d'approche est de maîtriser (et donc de caractériser) la taille des particules produites qui doivent être comprises dans la gamme de taille de rétention des modèles biologiques étudiés. Dans notre cas, ceci implique la production de petites particules comprises entre 2 et 200 µm qui correspondent à la gamme de taille de rétention de *P. margaritifera* (Pouvreau *et al.*, 1999). Or, la production de petites particules implique un risque plus élevé de produire des NP, considéré comme la « boîte noire » dans cette production de MP en laboratoire. En effet, les grandes différences entre MP et NP, notamment leurs propriétés physico-chimiques, leur traçabilité et leurs impacts sur le biote expliquent le besoin particulier de prévenir l'utilisation de NP en écotoxicologie lorsqu'ils ne sont pas standardisés ni caractérisés en amont. Il est également problématique de standardiser la dose exposée puisque la quantification des MP et des NP ne se fait pas du tout par les mêmes méthodes et appareillages ce qui implique des compétences diverses. La méthodologie de production de MP que j'ai développée dans ce travail est basée sur un cryobroyage des plastiques perlicoles suivi de plusieurs phases de tamisage liquide afin d'obtenir des MP compris entre 20 et 60 µm (gamme de taille restreinte par les tamis disponibles mais comprise entre 2 et 200 µm). La caractérisation des particules a révélé que les MP produits étaient bel et bien ≤ 60 µm mais une production non maîtrisée de NP a été mise en évidence. En effet, il est connu en laboratoire (mais aucune donnée publiée) qu'il est très difficile de régler finement le broyage et le tamisage pour éliminer une fraction indésirable, en particulier les plus petites comme les NP (Paul-Pont *et al.*, 2018). Ce résultat est similaire à certaines études (éco)toxicologiques qui ont

eu recours au broyage et tamisage et qui montrent une gamme de taille microscopique sans pour autant proposer de caractérisation dans la gamme nanométrique (*e.g.* Schür *et al.*, 2020). Néanmoins, certains auteurs effleurent cette question comme par exemple chez la moule après une exposition de *M. edulis* à des « MP », Revel *et al.* (2019) discutent d'une possible implication de NP dans la toxicité observée. La présence de NP peut être suggérée dans l'étude réalisée par Schür *et al.* (2020) qui ont utilisé des « MP ≤ 63 µm » alors que le seuil de coupure suggère l'existence de particules en deçà. En effet, le seuil de coupure lié à la caractérisation des particules de PS produites par cryobroyage et tamisage apparaît vers 2 µm dans la « Figure S6 » de leur article (**Figure 38**). Ce seuil est la limite basse de la capacité de mesure de leur appareil, un « coulter counter » de type Multisizer™ 3 (Beckman Coulter, Germany) monté avec une aperture de diamètre 100 µm permettant une fenêtre de mesure allant de 2 à 100 µm. Or, il est facile de suggérer que des particules sont présentes (en nombre non négligeable) en deçà de cette limite basse (*i.e.* < 2 µm ; **Figure 38**). Cependant, ce seuil de coupure bas n'est pas pris en compte dans les doses exposées ni dans les potentiels effets observés, avec le postulat que plus les particules sont petites plus elles sont toxiques (*e.g.* Jeong *et al.*, 2016 ; Ma *et al.*, 2016). Par conséquent, étant donné que les NP ont des propriétés spécifiques et sont considérés comme plus toxiques que les MP (Paul-Pont *et al.*, 2018), il est d'une grande importance d'avoir la distribution complète des tailles de particules. En effet, ne pas considérer leur abondance représente un biais méthodologique car sans caractérisation des tailles de particules, les doses d'exposition ne sont pas contrôlées, notamment en termes de concentrations numéraires, avec beaucoup plus de particules nanométriques dans les concentrations escomptées. Ceci constitue un vrai problème pour évaluer la toxicité des MNP et l'obtention de données robustes pour l'aide à la décision ; d'autant qu'aucune donnée n'est disponible concernant la contamination NP *in situ* (Schwaferts *et al.*, 2019). Ainsi, pour garantir une visibilité sur les paramètres d'exposition, les futures expérimentations doivent impérativement caractériser les MNP produits, et ce, dans les fractions micro et nano. L'utilisation d'un compteur de particules (*e.g.* Multisizer™), capteur FlowCam ou autre, est un bon moyen pour réaliser ce travail mais compte tenu des seuils de coupure autour de seulement quelques microns, l'analyse de la distribution des tailles doit être obligatoirement complétée par une méthodologie plus précise et appropriée telle que la granulométrie laser. Par conséquent, la production de MP en laboratoire représente un véritable challenge technique et méthodologique pour la communauté scientifique et un défi de taille pour maîtriser la taille des particules produites.

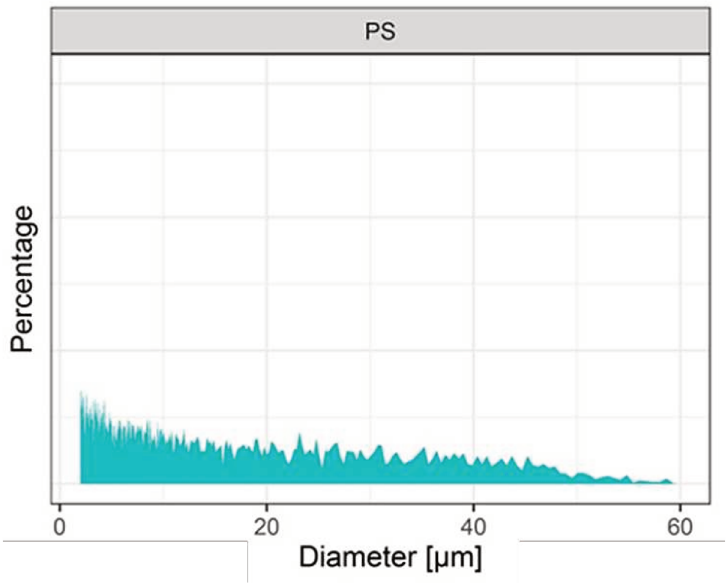


Figure 38. Distribution de la taille des particules de polystyrène (PS) produite et utilisées dans les travaux de Schür *et al.* (2020). *Tiré des données supplémentaires de cette article – Environmental Pollution.*

Dans ce contexte, le protocole de production de MP perlicoles a fait l'objet d'une approche méthodologique visant à améliorer nos connaissances sur la cinétique de production des MNP. Pour cela, plusieurs temps de cryobroyage ont été testés en fonction des deux types de plastiques perlicoles afin de déterminer l'influence de ce paramètre sur la quantité et la qualité des particules produites. L'objectif était de déterminer une durée optimale de broyage pour chaque plastique permettant d'obtenir des MP le plus proche possible de la fraction désirée (*i.e.* 20-60 µm). Une première caractérisation des MP produits a été réalisée au compteur de particules (*i.e.* Multisizer™ 3) équipé d'une aperture 100 µm permettant d'analyser les particules comprises entre 2 et 100 µm. Une seconde caractérisation, plus fine, par granulométrie laser est actuellement en cours à l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) et permettra de descendre jusqu'à 0,4 µm. Pour le moment, les résultats préliminaires de cette approche ont permis de mettre en évidence une divergence entre une pseudo-fraction « 20-60 µm » obtenue à l'issue du tamisage et la distribution réelle des tailles de particules présentes dans cette fraction. La caractérisation de la distribution des tailles par le compteur de particules avait démontré et quantifié les MP de 2-100 µm produits à partir des objets perlicoles, et ce n'est qu'à partir des données obtenues par granulométrie laser que nous pouvons contaster une production non négligeable de MP < 1 µm centrés sur une taille moyenne de 800 nm (analyses préliminaires effectuées par Fabienne Lagarde, Com. Pers.). Ce travail est un bon exemple de ce qui pourrait avoir eu lieu dans quelques travaux comme ceux de Schür *et al.* (2020). Cette discordance serait liée à des mécanismes physico-chimiques et électrostatiques très complexes d'auto-assemblage des particules dont les interactions évoluent en fonction des tailles de particules et de la matrice

dans laquelle ces particules sont tamisées puis analysées (*i.e.* éthanol, eau de mer, polymère, etc.). Cette notion met en évidence toute la complexité de ce champ d'investigation à la frontière entre physique-chimie et biologie. Ainsi, ce travail a permis de cibler un verrou méthodologique auquel la communauté d'écotoxicologues fait face et appelle au développement de nouvelles techniques et méthodologies. Il est présenté sous forme d'article en cours de rédaction (article 5) pour une soumission prévue début 2021 dans la revue scientifique *Analytical Methods – Communication* (facteur d'impact 2019 : 2.596).



Analytical Methods

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

COMMUNICATION TEMPLATE

The real challenge of producing more realistic microplastics to conduct relevant ecotoxicological experiments

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Tony Gardon,*[a] Fabienne Lagarde, [c] Ika Paul-Pont, [b] Claude Soyez, [a] Gilles Le Moullac [a] and Arnaud Huvet [b]

Ainsi, le protocole de production n'a pas permis de produire des MP mais bien des MNP perlicoles qui ont été utilisés pour évaluer leur impact sur l'huître perlière lors d'une seconde phase d'exposition. Cette expérimentation a été réalisée sur une période de 5,5 mois dans le but d'évaluer en laboratoire, l'impact des MNP perlicoles sur la biominéralisation et la qualité de la perle. L'approche consistait à exposer *P. margaritifera* à 3 doses de MNP : 0 ; 0,025 et 1 µg.L^{-1}. Ces concentrations sont issues d'une extrapolation des concentrations numéraires *in situ* en MP. En effet, la concentration massique de 1 µg.L^{-1} dite « *in situ* » testée dans cette étude correspond à une concentration massique (*i.e.* 0,677 µg.L^{-1}) qui a été extrapolée à partir de la concentration numéraire moyenne enregistrée à Takaroa (*i.e.* 134,7 MP.m^{-3}) en se basant sur une particule sphérique de 20 µm. Ainsi, cette extrapolation conduit inévitablement à des interrogations quant à la pertinence écologique de cette expérimentation entre les conditions réelles d'expositions des huîtres (qui restent inconnues pour des tailles < 20 µm ; *Chapitre III*, article 1) et les conditions testées (*i.e.* MNP compris entre 0,4 et 60 µm ; projection sur **Figure 37**). Par ailleurs, la dose plus faible de 0,025 µg.L^{-1} (**Figure 37**) a été déterminée dans le but d'identifier une fenêtre de réponse à laquelle des phénomènes de toxicité sont observés mais aussi de recouper avec la première expérimentation (*Chapitre IV*, article 2 et 3) en diminuant la dose minimale (*i.e.* 0,25 µg.L^{-1}) d'un facteur 10 (dose à laquelle des effets toxiques ont pu être démontrés). Il est important de noter que les deux doses testées dans cette seconde phase d'exposition (*i.e.* 0,025

et 1 µg.L^{-1}) font partie des doses les plus faibles, et donc potentiellement les plus proches de l'environnement, au sein de la littérature d'écotoxicologie (**Figure 37**).

Après avoir été marquées à la calcéïne et acclimatées (2 semaines), des huîtres donneuses et receveuses ont été exposées pendant 2 mois aux MNP perlicoles. Les huîtres receveuses ont ensuité été greffées avec les greffons des huîtres donneuses. Certains individus ont été greffés avec des nucléus aimantés permettant de suivre la rotation de la perle dans le sac perlier grâce à un magnétomètre. L'exposition des receveuses ainsi greffées a ensuite été poursuivie pendant 3 mois. L'impact des MNP a été évalué sur le bilan énergétique, la formation de la perle (rotation), la récolte (*i.e.* taux de rejet, production de perle ou keshi), la qualité de la perle (*i.e.* matière minérale sécrétée sur le nucléus, microstructures des dépôts nacriers), la croissance (grâce au marquage à la calcéïne) et les malformations coquillières, la gamétogénèse, les réserves énergétiques (*i.e.* dosage de glycogène dans le muscle), et sur le plan moléculaire par l'analyse des transcriptomes du manteau, du sac perlier et des hémocytes. La gonade a également été prélevée pour être analysée ultérieurement. Cette approche fonctionnelle a permis d'engranger une grande quantité de données dont une partie est toujours en cours d'analyse. Les résultats préliminaires de ce travail sont présentés sous forme d'un article en rédaction (article 6) pour une soumission prévue début 2021 dans la revue scientifique *Science Advances* (facteur d'impact 2019 : 13.116) :

Science Advances
AAAS

Manuscript Template

1 **Title**

2 **Microplastics as a threat for pearl-farming in French Polynesia**

3 **Authors**

4 T. Gardon,[1]* J. Le Luyer,[1] I. Paul-Pont,[2] A. Dehaut,[3] G. Duflos,[3] F. Lagarde-Abribat,[4] V.

5 Quillien,[1,2] L. Bish,[1] C. Soyez,[1] G. Le Moullac,[1] A. Huvet,[2]*

2. Article 4 (publié) – *Water Research*

Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Tony Gardon [a, *], Arnaud Huvet [b, *], Ika Paul-Pont [b], Anne-Laure Cassone [b], Manaarii Sham Koua [a], Claude Soyez [a], Ronan Jezequel [c], Justine Receveur [c], Gilles Le Moullac [a]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

[c] CEDRE – 715 rue Alain Colas, 29218 BREST Cedex 2, France

* *Corresponding author*

Highlights

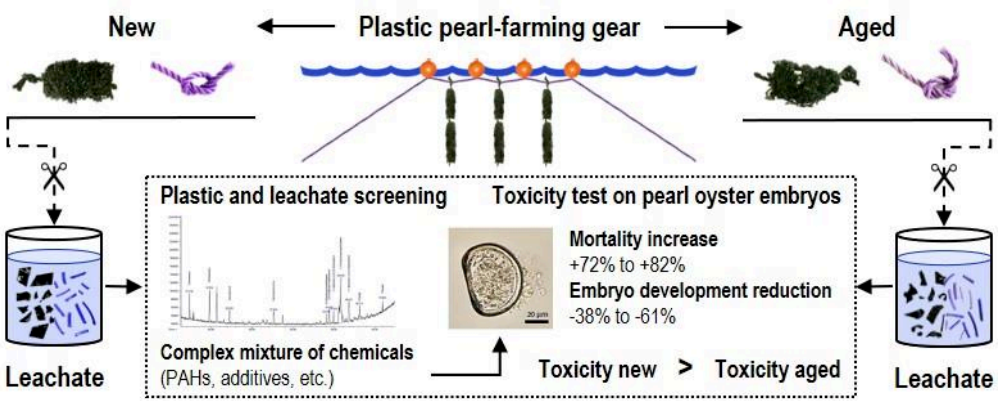
- Leachates from plastic pearl-farming gear impair pearl oyster embryo-larval development.
- Chemical screening showed a complex mixture of chemicals in plastic leachates.
- Leachates obtained from new plastic gear are more toxic than from aged ones.
- Plastic pearl-farming gear releases phthalates into the environment during use.

Abstract

Pearl-farming leads to significant plastic pollution in French Polynesia (FP) as the end of life of most farming gear is currently poorly managed. Plastic debris released into the aquatic environment accumulates, with potentially detrimental effects on the lagoon ecosystem and pearl oyster *Pinctada margaritifera*, a species of ecological, commercial and social value. Here, we tested the effects of leachates from new (N) and aged (A) plastic pearl-farming gear (spat collector and synthetic rope) obtnained after 24 h and 120 h incubation, on the embryo-larval development of the pearl oyster using an *in vitro* assay. Embryos were exposed for 24 h and 48 h to a negative control (0) and the leachate from 0.1, 1, 10 and 100 g of plastic L^{-1}. After 24 h exposure to leachate at 100 g L^{-1}, effects were observed on embryo development (–38% to –60% of formed larvae) and mortality (+72% to +82%). Chemical analyses of plastic gear indicated the presence of 26 compounds, consisting of organic contaminants (PAHs) and additives (mainly phthalates). Screening of leachates demonstrated that these compounds leach into the

surrounding seawater with an additional detection of pesticides. Higher levels of phthalates were measured in leachates obtained from new (6.7-9.1 µg L^{-1}) than from aged (0.4-0.5 µg L^{-1}) plastics, which could be part of the explanation of the clear difference in toxicity observed after 48 h exposure at lower concentrations (0.1 to 10 g L^{-1}), associated with mortality ranging from 26-86% and 17-28%, respectively. Overall, this study suggests that plastic gear used in the pearl-farming industry releases significant amounts of hazardous chemicals over their lifetime, which may affect pearl oyster development that call for *in situ* exploration.

Graphical abstract



Keywords

Aquaculture | Synthetic materials | Hazardous chemicals | Toxicity | Marine bivalve | Early development

Abbreviations

BaP	Benzo[a]pyrene
DBP	Dibutyl phthalate
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DEHA	Bis(2-ethylhexyl) adipate
DEHP	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
DEP	Diethyl phthalate
DMP	Dimethyl phthalate
EC_{50}	Half maximal effective concentration

FP	French Polynesia
GC/MS	Gas-chromatography coupled to mass spectrometry
HCH	Hexachlorocyclohexane
HDPE	High-density polyethylene
LC_{50}	Median lethal concentration
LDPE	Low-density polyethylene
MPs	Microplastics
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PBDEs	Polybrominated diphenyl ethers
PC	Polycarbonate
PCBs	Polychlorinated biphenyls
PE	Polyethylene
PET	Polyethylene terephthalate
PP	Polypropylene
PS	Polystyrene
PVC	Polyvinyl chloride
SLE	Supported liquid extraction
TD	Thermal desorption

Introduction

Driven by growing demand, plastics production continues to increase worldwide reaching 359 million tons in 2018 (PlasticsEurope, 2019). Ultimately, however, the final destination for anthropogenic pollutants from land or sea, including plastics, is the marine environment (Halpern *et al.*, 2008). A predicted 4.8-12.7 million tons of plastic waste enter the ocean every year (Jambeck *et al.*, 2015), leading to an estimated 5 trillion pieces of plastic (over 250,000 tons) floating at the sea surface (Eriksen *et al.*, 2014). Besides sampling campaigns and monitoring efforts on plastic debris, microplastics (MPs, plastic particles < 5 mm) have recently received increasing attention. Given their ubiquitous nature and small size, MPs are likely ingested by a wide range of marine organisms leading to various biological effects, as demonstrated under

laboratory conditions. Most laboratory experiments on MP exposure emphasise the biological effects induced by ingestion but distinguishing physical effects from chemical ones remains challenging, despite an increasing body of evidence showing the role of chemical aspects of the observed toxicity (Karami, 2017; Anbumani and Kakkar, 2018). Indeed, plastic debris may also act as a vector of hazardous chemicals, such as additives (*e.g.* plasticisers, stabilisers, antioxidants, catalysts; Lithner *et al.*, 2011; Hermabessiere *et al.*, 2017) and/or adsorbed chemicals (*e.g.* PCBs, PAHs, pesticides), which can leach into the surrounding environment and be transferred into marine organisms (Mato *et al.*, 2001; Teuten *et al.*, 2009). Although the transfer of adsorbed pollutants by plastic may be negligible compared with other natural pathways at sea (*e.g.* detritus, colloids, bacteria, phytoplankton, organic matter, food, etc.), this is supposedly not the case for plastic additives (Koelmans *et al.*, 2016). Several studies have demonstrated enhanced desorption of chemicals in the gut upon plastic ingestion, resulting in their bioaccumulation and the deterioration of key physiological functions of the organisms (*e.g.* Browne *et al.*, 2013; Koelmans *et al.*, 2013, 2014; Rochman *et al.*, 2013, 2014). Most research carried out on toxic effects mediated by plastics has been conducted by direct exposure of organisms to contaminated plastic debris once ingested. Nevertheless, few studies have demonstrated the indirect toxicity mediated by plastic leachates, *i.e.* desorption of chemicals into the surrounding environment in the absence of plastic ingestion.

The first leaching studies on marine organisms were conducted on plastic consumer products (*e.g.* DVD-case, biodegradable bag, phone cover, plastic cup, etc.) of various polymer types (Lithner *et al.*, 2009, 2012; Bejgarn *et al.*, 2015). The acute toxicity of non-weathered plastic leachates (including 11 plastic products) was demonstrated by significant mortality (EC_{50}) in *Daphnia magna* occurring after 48 h exposure to concentrations ranging from 2 to 235 g L^{-1} (Lithner *et al.*, 2012). Similarly, exposure of the copepod *Nitocra spinipes* to leachates of non-weathered products at 100 g L^{-1} for 96 h led to LC_{50} from 7% to 100% leachate (Bejgarn *et al.*, 2015). After weathering, toxicity either increased or decreased depending on the plastic type (Bejgarn *et al.*, 2015). Exposure to plastic leachates obtained from seven polymer groups (HDPE, LDPE, PP, PVC, PC, PET and PS) also increased barnacle nauplii mortality (+11% to +22%) at the highest tested concentration (0.5 m^2 plastic materials.L^{-1}) and inhibited larval settlement after 24 h from –30% to –42% (H.-X. Li *et al.*, 2016). Gandara e Silva *et al.* (2016) also showed a higher toxicity of leachates obtained from beached pellets (42% PE and 58% unknown composition) than from virgin pellets (PP) on embryo development of the brown mussel, with 100% and 23%, respectively, of dead or abnormal embryos, suggesting a difference in the chemical load depending on pellet history (*i.e.* adsorbed contaminants for beached pellets *vs* additives for virgin pellets). Reports have underlined the importance to consider the diversity of chemicals used during plastic manufacturing and those adsorbed once plastics enter the environment, all of which could play a role in toxicity.

The level of fishing and aquaculture activity is known to contribute significantly to the amount of plastic waste discharged into the ocean (Hinojosa and Thiel, 2009; W. C. Li *et al.*, 2016). In French Polynesia (FP), pearl oyster aquaculture is a specific source of plastics (Andréfouët *et al.*, 2014). Indeed, the economic decline of pearl-farming in the 2000s left behind it the vestiges of intense activity as many concessions later closed and the associated rearing structures were abandoned. Added to this a common practice on operational pearl farms is to dispose of inoperative farming structures by scuttling them at the bottom of lagoons. The inventory carried out by Andréfouët *et al.* (2014) in the lagoon of Ahe (FP) where pearl oysters are cultured revealed large quantities of collectors, ropes, buoys and nylon ties. All of these rearing structures, essentially made of synthetic materials, are accumulating over time in lagoons and may fragment and weather. This situation is worsened by the semi-enclosed environments of some of these lagoons, which could favour MP accumulation (Andréfouët *et al.*, 2014). A recent laboratory experiment conducted by Gardon *et al.* (2018) highlighted the impact of commercial virgin micro-PS (polystyrene microbeads) on energy balance and gametogenesis of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*, and pointed out the need to differenciate physical and chemical effects so as to better understand the risk. In order to go further, estimating the effects of local scenario for coastal organisms will be necessary to assess risks, here associated with the presence and ageing of pearl-farming structures in Polynesian lagoons. Experimental work is a first step which opens up questions on the field to ultimately alert and support decision.

In this study, we conducted experiments to evaluate the toxicity of leachates obtained from new and aged plastic farming gear on embryo-larval development of the pearl oyster (*P. margaritifera*). Focussing on non-ingestion pathways and therefore the effects mediated through chemicals leaching into the water, embryos of *P. margaritifera* were exposed to leachates from spat collectors and synthetic rope: two types of farming gear that oysters encounter in the field. In this context, we performed large-scale chemical screening on the plastic gear and plastic leachates used for the toxicological assay in order to identify the major contaminants in fractions of both new and aged gear.

Materials and methods

Plastic selection

Based on Andréfouët *et al.* (2014), our study focused on the most abundant plastic debris collected in FP pearl-farming atoll lagoons, specifically spat collectors (shade-mesh) and synthetic ropes mostly made from polypropylene (PP) and polyethylene (PE), respectively, polymers that represent more than 50% of global plastic production (PlasticEurope, 2019). New plastic gear was obtained from local suppliers in FP (POE import) and aged ones were collected

directly in the vicinity of a pearl-farm located in Manihi (14°24′10″S, 145°57′29″W, FP). FTIR microspectroscopy analysis confirmed that the spat collectors and synthetic rope used in this study consisted of PP and PE, respectively, for both the new and aged gear; no additional features were identified in the spectra of any samples (**Figure S1**).

Microplastic production

Aged spat collectors and synthetic ropes were washed in saline water (100 g of $NaCl.L^{-1}$) aiming to remove most of the microorganisms potentially present, then rinsed thoroughly and dried in a proofer at 60°C for 48 h. No pre-washing of new equipment was done so as to test the first leaching water. To facilitate leaching and increase the surface area available during incubation, spat collectors (MPs-1) and synthetic ropes (MPs-2) coming from both new and aged plastic gear were cut with clean, stainless steel scissors into ≤ 5 mm pieces. Pictures were taken of the MPs produced using an illuminated binocular magnifier (Leica M80) equipped with a camera (Leica MC170 HD) (**Figure 1**).

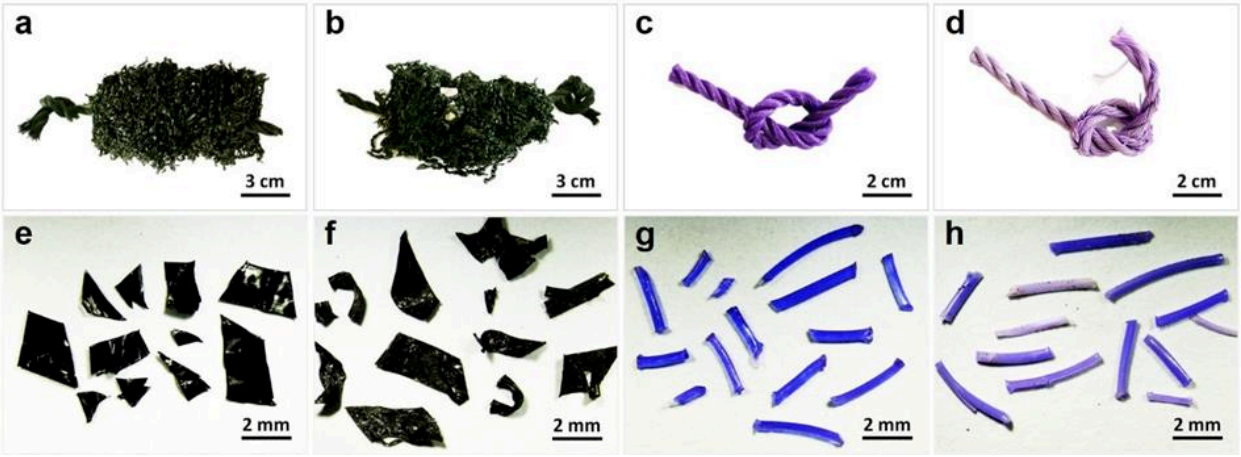


Figure 1. Plastic pearl-farming gear (**a**-**d**) used to prepare microplastics (**e**-**h**) employed for leachate preparation. Pictures show new (**a**, **e**) and aged (**b**, **f**) spat collectors, and new (**c**, **g**) and aged (**d**, **h**) synthetic rope in whole form and cut into microplastics.

Leachate preparation

Leaching was performed according to the European Committee for Standardization CEN/TC 444 – EN 12457-4 (CEN, 2002) increasing leaching time from 24 h in the norm to 120 h. These leaching times were chosen in order to cover the range of leaching time tested in the literature (*i.e.* mainly 24 h and up to 96 h; Lithner *et al.*, 2012; Bejgarn *et al.*, 2015; Nobre *et al.*, 2015;

Gandara e Silva *et al.*, 2016; H.-X. Li *et al.*, 2016) and exceed this time through the 120 h-leachate to assess toxicity over a longer leaching period.

Leachates were prepared by putting 50 g of MPs (25 g MPs-1 and 25 g MPs-2) in 500 ml seawater in a previously autoclaved 1-L glass bottle (100 g L^{-1}). The seawater used for preparing the leachates was pumped from the lagoon of Vairao (17°48′23″S, 149°2′41″W, Tahiti, FP), mechanically filtered on a 1 µm sock filter, UV treated and autoclaved (salinity = 35 psu; pH = 8.2). Leaching was performed for 24 h and 120 h under artificial light (400-750 nm, 30 W, 2400-2700 lm) at 28°C on a magnetic agitator at 600 rotations per minute (rpm). Five leaching treatments were applied: new MPs 24 h (N-24) and 120 h (N-120) leachates, aged MPs 24 h (A-24) and 120 h (A-120) leachates and a control seawater treatment with no MPs. After the leaching period, leachates were separated from MPs by filtration on GF/C filters (1.2 µm of porosity, Ø 90 mm, Whatman™) and filtered a second time on 0.22 µm Millipore filters (Whatman™) in 500 ml glass bottles previously autoclaved (similarly for the control). For each treatment, 100 ml of pure leachate (100 g L^{-1}) were sampled for chemical analyses. A diagram of the experimental design is given in **Figure 2**.

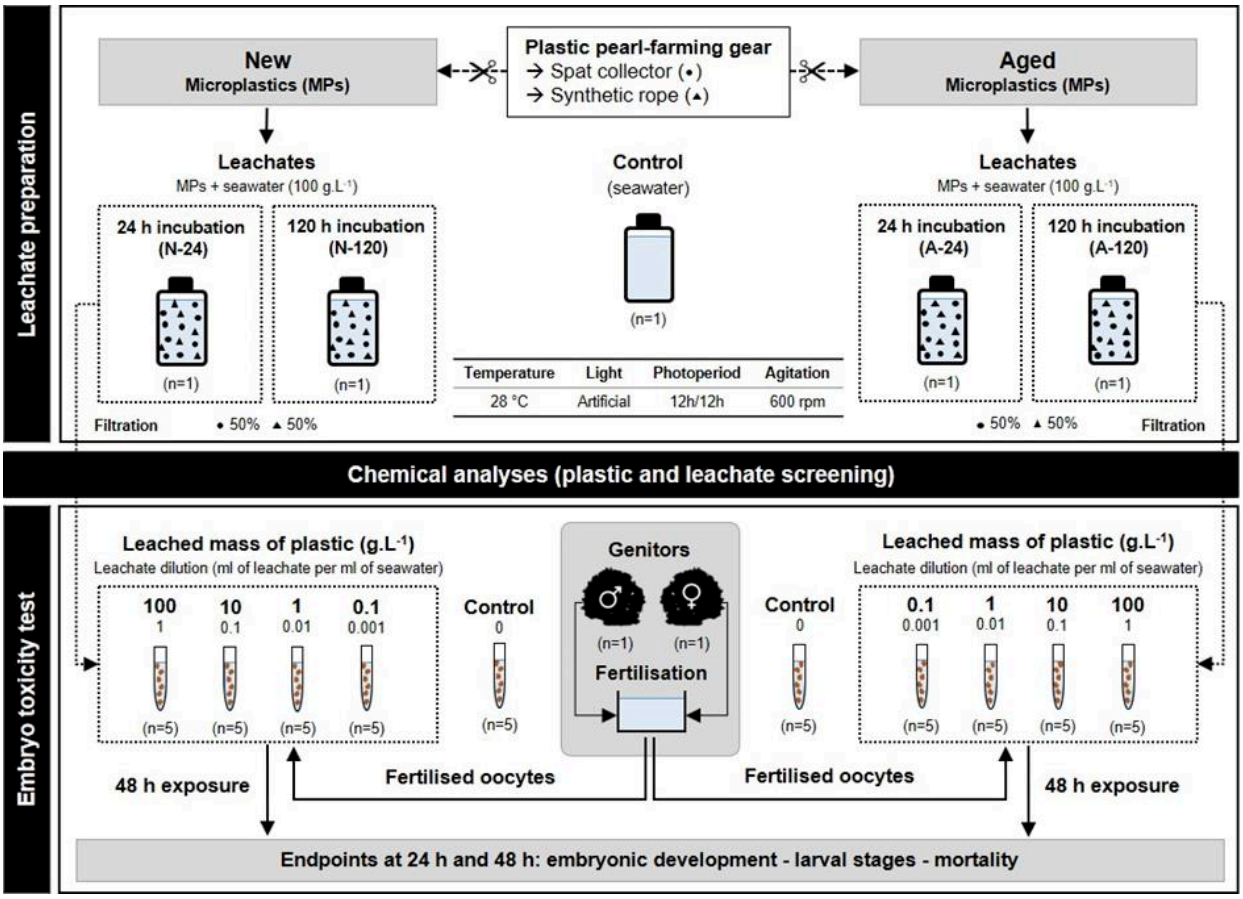


Figure 2. Experimental design.

Broodstock conditioning and spawning

Adult *Pinctada margaritifera* individuals (aged 8 to 10 years) were collected from Vairao lagoon (Ifremer marine concession No. 8120/MLD: 17°48′26.0″S, 149°18′14.4″W, Tahiti, FP). The animals were cleaned and transferred to the laboratory to serve as genitors for the embryo-larval exposure. For this toxicity test, 40 females and 30 males were placed in seawater at 21°C with aeration and left in the dark overnight in an air-conditioned room. Following this period, the cold-water bath was drained and replaced with filtered seawater at 28°C. Gamete release was stimulated by thermal shock (Le Moullac *et al.*, 2003). Individuals that responded to this thermal shock were each isolated in a 2-L glass beaker with 1-µm-filtered and UV-treated seawater. One female and one male were selected for the experiment. Oocyte and sperm concentrations were determined using a Multisizer^{TM} 3 Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) equipped with a 100 µm aperture tube. Gametes were pooled into a 2-L glass beaker at a sperm/oocyte ratio of 100:1 (Hui *et al.*, 2011) to allow fertilisation (90% fertilisation success) before the beginning of the exposure.

Chemical analyses

Screening of plastics

To allow the analysis of a maximum number of compounds, two protocols were employed for each plastic sample (new and aged) used to produce the leachates. The first protocol carried out a thermal desorption (TD) directly on plastics and analysed chemical compounds by gas-chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The second protocol consisted of dissolving plastics in a solvent (supported liquid extraction [SLE]) and analysed compounds after liquid injection (GC/MS).

Quantification by TD-GC/MS. Approximately 1 mg of each plastic type was weighed with precision then transferred to a pyrolysis vial. GC/MS analysis was performed with a gas chromatograph (Agilent 7890N) equipped with a Combipal MPS2 multifunctional injection system (Gerstel, Switzerland), used in *'splitless'* mode, and a pyrolyser (Gerstel Pyro). The temperature-controlled cooling injection system (CIS) was programmed from –35°C (0.05 min) to 340°C (4 min) at 12°C s^{-1}. During desorption time, the temperature of the interface was maintained at 350°C. The oven temperature program was from 50°C (0.5 min) to 150°C at 15°C min^{-1}, then up to 315°C (5 min) at 7°C min^{-1}. The carrier gas was helium at a constant rate of 1.2 ml min^{-1}. The capillary column was an HP-5-MS (Agilent Technologies): 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm (film thickness). The chromatograph was coupled to a 5975N mass spectrometry detector. Semi-quantitative compounds analysis was carried out in single ion monitoring (SIM) mode with the

molecular ion of each compound of interest (minimum of 1.5 cycles s^{-1}) (listed in **Tables S1** and **S2**). Limits of quantification (LOQ) were calculated according to Shrivastava and Gupta (2011) using the calibration curves method. Analytes were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 10 ng. For PAHs, PCBs and pesticides quantification, naphthalene-d_8, biphenyl-d_{10}, phenanthrene-d_{10}, pyrene-d_{10}, chrysene-d_{12}, benzo(a)pyrene-d_{12} and benzo(g, h, i)perylene-d_{12} were used as standards. For plastic additives, phthalates and PBDE, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) d_4 and BDE 77 were respectively used as standards. All standards were obtained from LGC Standard (Wesel, Germany) and Interchim (Montluçon, France).

Dosage by SLE-GC/MS. Approximately 50 mg of each plastic type were dissolved in 10 ml of toluene (reflux during 10 min) then re-concentrated to 250 µl. A volume of 10 µl of the solution was doped with deuterated PAHs, deuterated phthalates and PBDEs, then analysed by GC/MS in the same conditions as previously described for TD-GC/MS.

Screening of leachates

A stir bar sorptive extraction was performed before TD-GC/MS analysis as decribed by Lacroix *et al.* (2014). At first, a polydimethylsiloxane stir bar (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany) was placed in the 100 ml leachate (opaque glass flask) then closed and placed on a magnetic agitator (MIX15, Munich, Germany) for 16 h of extraction at 700 rpm in the dark at room temperature. After the extraction step, stir-bars were retrieved, rinsed with distilled water and placed on a gas chromatography system Agilent 7890A coupled with an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, LittleFalls, USA) and equipped with a thermal desorption unit combined with a cooled injection system (CIS) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Thermodesorption was performed at 280 °C for 6 min and samples where then cryofocused in the CIS at –10°C. Injection in the GC-MS/MS system was carried out in splitless mode and the CIS was heated to 300°C at 12°C.s^{-1}. The GC temperature program was set as follows: 70 °C for 0.5 min, then increase to 150°C at 20°C.min^{-1} and finally increase to 300°C at 7°C.min^{-1}, maintained for 5 min. A Rxi-5MS (30 m, 0.25 mm, 25 mm thickness) (Restek, Lisses, France) capillary column was used. Helium was used as a carrier gas with a constant flow rate of 1 ml min^{-1}. The quantitative analysis of PAHs, PCBs, pesticides, PBDEs and phthalates was carried out by internal calibration in multiple reaction monitoring mode with two transitions for each compound, one (Quantify) for quantification, the other (Qualify) for confirmation of the molecular nature by calculating the ratio Qualify/Quantify and by comparison with reference values of pure compounds. The acquisition frequency for each fragment was 2 cycles s^{-1}.

Toxicity test on pearl oyster embryos

The ecotoxicological assay consisted of a factorial design with two factors: treatment (*i.e.* control, N-24, A-24, N-120 and A-120 leachates) and leachate concentration; 1 (pure leachates made from 100 g of plastic L^{-1}), 0.1, 0.01 and 0.001 ml of leachates per ml of seawater (ml ml^{-1}), and a control treatment (seawater with no addition of leachates). Dilutions were realised by mixing leachates with filtered seawater (UV-treated and filtered on a 0.22 µm Millipore filter). The leachate concentrations can be expressed as leached mass of plastic L^{-1}. Applying this methodology, the resulting exposure levels used throughout the present study were: 0 (control), 0.1, 1, 10 and 100 g L^{-1}. Even though the presence of plastic products with the leachate seems to be an important factor when assessing plastic toxicity (Nobre *et al.*, 2015; Gandara e Silva *et al.*, 2016), we used leachate alone in order to focus on chemical toxicity and avoid confounding factors in this experiment (Lithner *et al.*, 2009, 2012; Bejgarn *et al.*, 2015). An embryo toxicity test was performed according to the ASTM guideline E724-98(2012) (ASTM, 2012) and implemented to our model species *P. margaritifera* (black-lip pearl oyster).

The toxicity test was conducted in five replicates in glass test tubes (18 × 150 mm) previously annealed at 450°C. Fertilised oocytes from the fertilisation were filtered on a 20 µm mesh sieve and concentrated in a glass beaker to obtain a final concentration of 7,800 fertilised oocytes ml^{-1}. We added 300 fertilised oocytes to each test tube, thus starting the exposure period of the toxicity test. Population monitoring was established after 24 h and 48 h exposure by homogenising the medium, extracting 4 ml and adding 2-3 drops of formalin. Population analysis was performed using an optical microscope (ZEISS Axiostar) for the total count (magnification × 200) and population characterisation (magnification × 400). We determined the percentage of embryonic development, defined here as the total count of formed larvae (*i.e.* trocophore larvae, and both alive and dead D-stage larvae) out of 300 fertilised oocytes at 24 h and associated percentages of larval stages (*i.e.* trocophore, D-stage and dead larvae) at 24 h and 48 h, respectively, in order to obtain population proportions and cumulative mortality (developmental arrest and dead larvae) (ASTM, 2012). Dead larvae were discriminated from D-stage larvae by their empty shells.

Statistical analysis

All data were expressed as percentages (mean ± standard deviation) and transformed by the arcsine square-root function before statistical analysis. Normality and homoscedasticity were tested with Shapiro–Wilk and Levene's tests, respectively. Data complying with the conditions of normal distribution and homogeneity of variance were analysed using a two-way parametric ANOVA to test the differences in variables between factors (*i.e.* treatment and leachate

concentration). Whenever necessary, a Tukey's post-hoc test was used to determine the significant differences between the averages of each group. When assumptions of normality and homogeneity of variance were not met, we used the two-way non-parametric Scheirer–Ray–Hare (SRH) ANOVA with interaction. To avoid ranking comparison, Dunn's test was used on pooled factors in order to determine the significant differences between the averages of each group. Data presented in the figures are not square root transformed. In all cases, $p < 0.05$ was defined as the threshold of statistically significant differences. All analyses were performed in statistics software RStudio v3.5.

Results

Screening of plastics and leachates

Chemicals in plastic gear

Among all targeted PAHs, exploratory chemical analyses identified the presence of 20 PAHs (**Figure S2**). Relative abundances were noticeably similar between the two extraction methods, with complementary information depending on the compounds. Corresponding raw data are given in **Table S1**. Regarding additives, phthalates (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA and DEHP) and the antioxidant Irgafos 168® were detected with both protocols. However, the SLE-GC/MS method, which integrates a dissolution phase in solvent, revealed outliers in the experimental blank linked to a phthalate contamination. This kind of contamination is well known in chemical laboratories and seawater used for calibration curves (*i.e.* no water is "phthalate free"; Fankhauser-Noti and Grob, 2007), making it particularly difficult to determine phthalates in environmental matrices (*e.g.* tissue, water or sediment). In contrast, the TD-GC/MS method provided more relevant values with lower contamination; results are presented in **Figure S3** and the corresponding raw data are given in **Table S2**. After blank correction (*i.e.* samples were adjusted by substracting the contribution from the blank control), phthalate concentrations reached 79 and 73 µg g^{-1} for new and aged spat collectors, respectively, and, 252 and 78 µg g^{-1} for new and aged synthetic ropes, respectively. Screening was also performed for PCBs, pesticides and PBDEs and no compounds of these three families were detected in spat collectors and synthetic ropes.

Chemicals in leachates

Chemical analyses performed on leachates quantified total concentrations of PAHs, PCBs, pesticides, PBDEs and phthalates for each treatment (**Figure 3**). PAH concentrations were 10.8, 4.7, 5.4 and 7.9 ng L^{-1} in N-24, N-120, A-24 and A-120, respectively, and 6.4 ng L^{-1} in the control

treatment. PCBs, at a concentration of 2.2 ng L^{-1}, were only found in the N-24 treatment. Concerning pesticides, concentrations of 7.5, 6.0, 7.3 and 40.6 ng L^{-1} were found in N-24, N-120, A-24 and A-120, respectively, and 21.7 ng L^{-1} in the control treatment. PBDEs were detected in the control treatment only at a concentration of 2.4 ng L^{-1}. Phthalate concentrations reached 6,681, 9,077, 539 and 430 ng L^{-1} for N-24, N-120, A-24 and A-120, respectively, and 2,314 ng L^{-1} in the control treatment. Detailed results are given in **Table S3**.

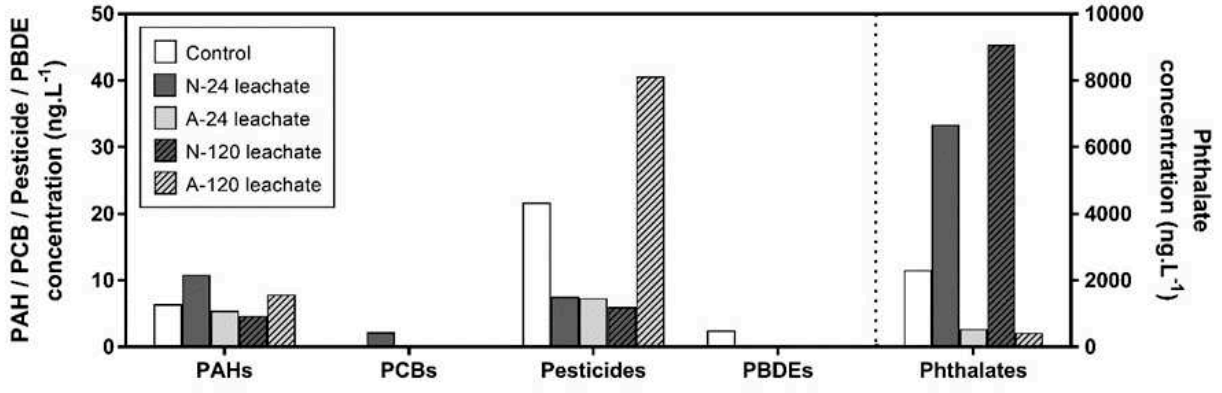


Figure 3. Chemical compounds quantified by SBSE-TD-GC/MS in pure 24 h and 120 h leachates from new and aged plastics at 100 g L^{-1}. PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons, PCB: polychlorinated biphenyls, PBDE: polybrominated diphenyl ethers.

Embryo-larval development

Mortality

After 24 h exposure, the two-way ANOVA on cumulative mortality (**Table S4**) indicated significant effects of treatment (p = 0.0031) and leachate concentration (p < 0.001). Pairwise comparisons showed a significantly higher cumulative mortality in N-24, A-24, N-120 (100%) and A-120 (90.1 ± 3.0%) at 100 g L^{-1} (p < 0.001) compared with the control (18.3 ± 11.1%) (**Figure 4**a). After 48 h exposure, the two-way ANOVA on mortality (**Table S4**) revealed a highly significant effect of treatment (p < 0.001), leachate concentration (p < 0.001) and a small interaction (p = 0.0211). Pairwise comparisons showed significant differences in cumulative mortality for control (10.0 ± 13.8%) *vs* N-24, A-24, N-120 (100%) and A-120 (93.8 ± 4.6%) at 100 g L^{-1} (p < 0.001); *vs* N-24 at 10 g L^{-1} (58.8 ± 30.8%, p = 0.0064); and *vs* N-120 at 0.1 and 1 g L^{-1} (85.9 ± 3.0% and 65.7 ± 24.5%, respectively, p < 0.001) and 10 g L^{-1} (59.5 ± 19.9%, p = 0.0034)

(**Figure 4**b). Detailed Tukey's test results on mortality data at 24 h and 48 h, including the significant differences between other treatments, are given in **Table S5**.

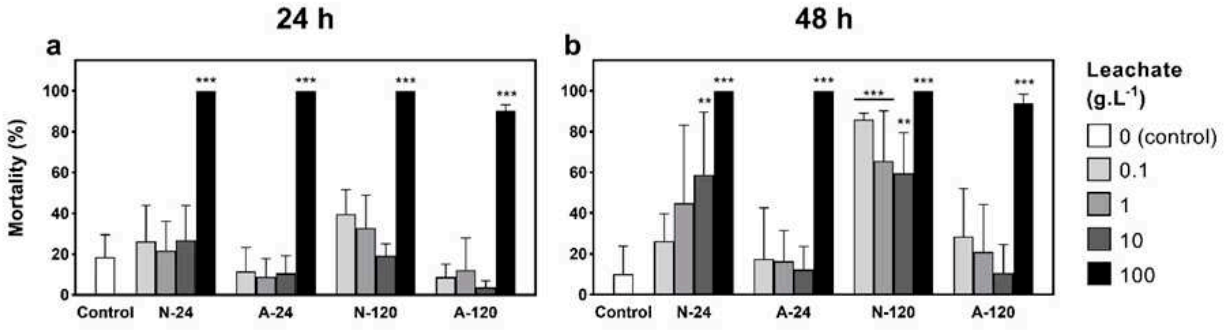


Figure 4. Mortality after 24 h (**a**) and 48 h (**b**) exposure to leachates from new and aged plastic gear. Mean (n = 5) ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) from the control (Tukey's post-hoc test: " ** ", $p \leq 0.01$; " *** ", $p \leq 0.001$).

Embryonic development

Embryo development (**Table S6**) was significantly affected by treatment (ANOVA, $p = 0.0011$) and leachate concentration (ANOVA, $p < 0.001$). Indeed, pairwise comparison showed a significant alteration of embryo development in the number of larvae formation from fertilised oocyte in N-24 (44.7 ± 6.8%, $p = 0.0041$), A-24, N-120 (30.3 ± 14.9% and 22.4 ± 2.9%, respectively, $p < 0.001$), and A-120 (44.9 ± 12.4%, $p = 0.0043$) at the highest concentration of 100 g L^{-1} compared with the control (82.9 ± 11.3%) (**Figure 5**). Detailed Tukey's test results are given in **Table S7**.

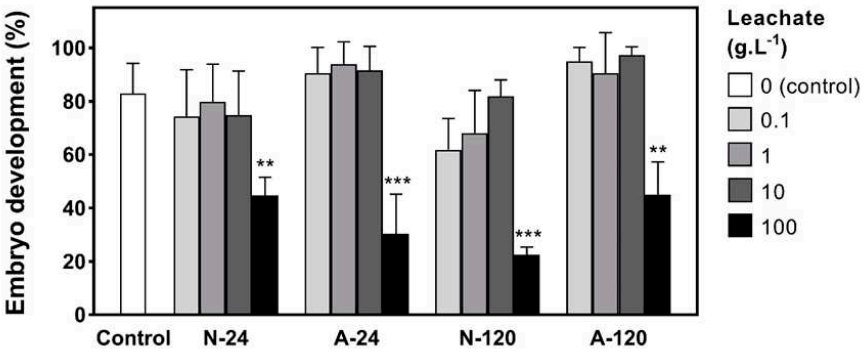


Figure 5. Percentage of embryonic development of fertilised oocytes after 24 h exposure to leachates from new and aged plastic gear. Mean (n = 5) ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) from the control (Tukey's post-hoc test: " ** ", $p \leq 0.01$; " *** ", $p \leq 0.001$).

Larval stages

At 24 h, the two-way ANOVA performed on the percentage of trocophore larvae (**Table S8**) revealed a significant effect of leachate concentration ($p < 0.001$) with a strong interaction with treatment ($p < 0.001$). The exposure at 100 g L^{-1} in A-24 and N-120 led to a 100% developmental arrest at the trocophore stage except for N-24 and A-120 with 99.6 ± 0.8% and 61.7 ± 9.5%, respectively, leading to a significant difference with the control treatment (1.4 ± 1.1%**,** $p < 0.001$) (**Figure 6**d). As a consequence of this developmental arrest, the percentage of D-stage larvae formation (**Table S8**) in N-24, A-24, N-120 (0.0 ± 0.0%) and A-120 (22.9 ± 7.3%) at 100 g L^{-1} was almost null and significantly lower than the control ($p < 0.001$) (**Figure 6**e). The two-way ANOVA revealed a significant effect of leachate concentration ($p < 0.001$) with a strong interaction with treatment ($p < 0.001$). Proportions of dead larvae (**Table S8**) were analysed by SRH test, which revealed significant effects of treatment ($p < 0.001$) and the interaction ($p = 0.0127$). The pairwise comparison revealed a significantly higher percentage of dead larvae in A-120 at 100 g L^{-1} (15.4 ± 9.2%, $p = 0.0008$) compared with the control (0.1 ± 0.3%) (**Figure 6**f). No difference with N-24, A-24 and N-120 at 100 g L^{-1} was observed since D-stage larvae formation did not occur in these treatments and therefore none associated dead larvae. Detailed post-hoc test results performed on larval stages at 24 h are given in **Table S9**.

At 48 h, similar effects were observed on larval stages (**Table S10**) for all leachate treatments at the highest concentration (100 g L^{-1}) (**Figure 6**g-i). In addition, effects at the lower concentrations (0.1, 1 and 10 g L^{-1}) were observed. Pairwise comparison showed a significant decrease of D-stage larvae in N-120 at 0.1 g L^{-1} (24.3 ± 11.4%, $p = 0.0052$) compared with the control (99.3 ± 0.6%) (**Figure 6**h). Significantly higher proportions of dead larvae were also observed in N-120 at 0.1 (75.7 ± 11.4%) and 1 (53.7 ± 26.2%) g L^{-1} ($p = 0.0021$ and $p = 0.0424$, respectively) compared with the control (0.7 ± 0.6%) (**Figure 6**i). Detailed post-hoc test results performed on larval stages at 48 h are given in **Table S11**.

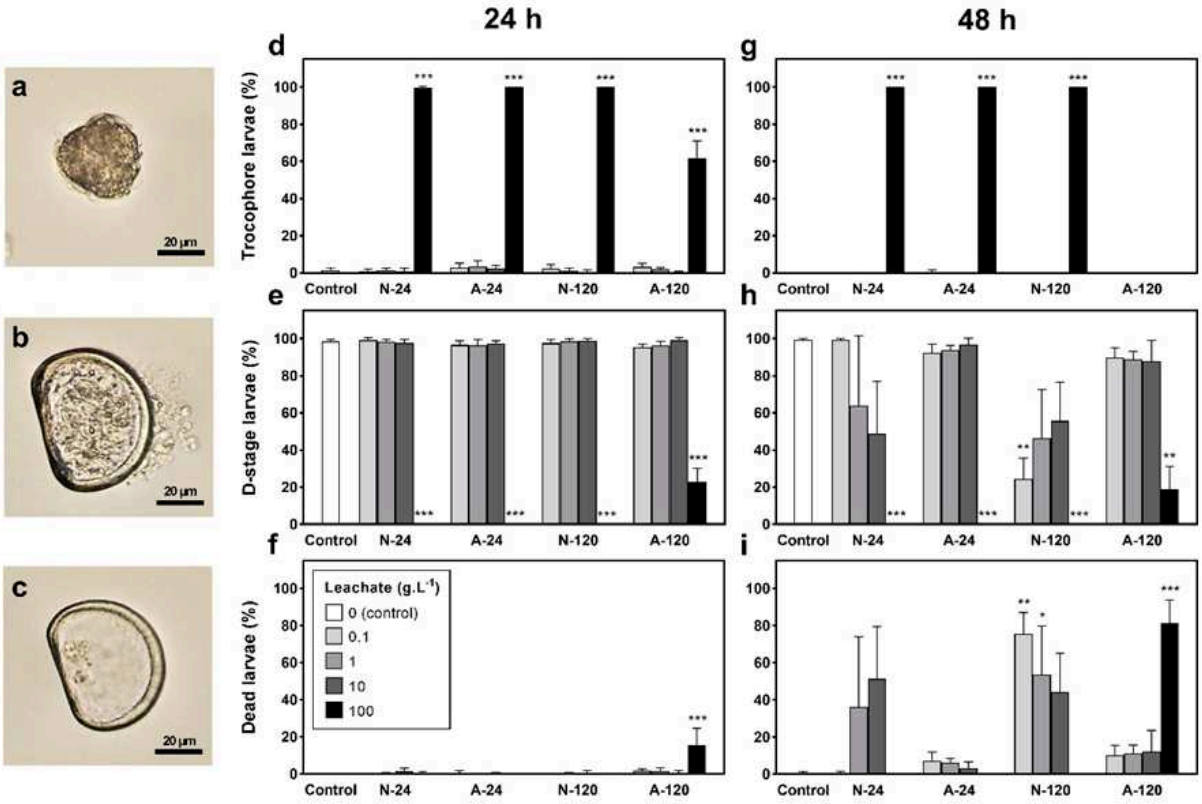


Figure 6. Larval stages after 24 h (**d**-**f**) and 48 h (**g**-**i**) exposure to leachates from new and aged plastic gear. Pictures show the different larval stages/states: trocophore (**a**), D-stage (**b**) and dead (**c**) larvae. Mean (n = 5) ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) from the control (" * ", $p < 0.05$; " ** ", $p \leq 0.01$; " *** ", $p \leq 0.001$).

Discussion

Phthalates desorption from plastic gear

Leachate screening provided information on the chemicals associated with plastic collector and rope that desorbed into the surrounding media. Although some chemicals identified on these plastic samples appeared below the detection and/or quantification limit, PAHs and additives were successfully quantified in leachates in addition to the detection and quantification of PCBs, pesticides and PBDEs. Levels of PAHs, pesticides, PBDEs and phthalates quantified in the control (with no plastic gear added) indicated an existing contamination of seawater employed in this experiment and/or during sample preparation and chemical analyses (laboratory plastic). This result underline the difficulties of studying unknown and most of the time unidentifiable chemical composition of plastic leachates (Zimmermann *et al.*, 2019). Indeed, it is well recognised that minimizing external contamination by ubiquitous plastisizers and other chemicals is a real challenge in biomonitoring studies (Ye *et al.*, 2013). Composition of natural seawater at

global scale is subject to an irreversible modification by a multitude of organic pollutants at ultra-trace levels (Dachs and Méjanelle, 2010). Using quality control blanks or samples to assess potential contamination during analysis and the accuracy of measurements is difficult since their contamination is a *quasi*-systematic phenomenon (Taylor, 1981; Fankhauser-Noti and Grob, 2007). Besides anthropogenic organic chemicals introduced in the marine environment (Dachs and Méjanelle, 2010), several reports have investigated and pointed out potential sources of contamination such as indoor air (Alcock *et al.*, 1994; Fankhauser-Noti and Grob, 2007), solvents (including water), reagents, experimental apparatus and protection equipment for sample preparation in laboratory environment (*e.g.* gloves) (Sjödin *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2013). Thus, because contamination affecting quality control samples cannot be avoided completely, the concentration of samples should be adjusted by substracting the contribution from the quality control (Ye *et al.*, 2013) as we did here. Nonetheless, we note that, for some molecules, the contamination should be present at least at the same concentration or above in the leachate treatments. However, the leachate results showed lower levels of pesticides (except for A-120), PBDEs and phthalates (only for A-24 and A-120) than the control, suggesting that we cannot exclude a potential adsorption of these chemicals by MPs (Lee *et al.*, 2014) used for leachate preparation. Despite control contamination, a real difference in chemical composition of new and aged plastic leachates was detected concerning PAHs and pesticides families. PAHs such as benzo[a]pyrene (BaP), chrysene and pesticides as σ- and γ-hexachlorocyclohexane (HCH), chlorpyrifos and σ-endosulfan were quantified in higher levels (from 2 to 20 times higher) in the A-120 treatment, indicating a potential adsorption of these chemicals in the marine environment (Teuten *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014). Furthermore, additives, especially phthalates, represented the highest levels of quantified chemicals in leachates, with a major part attributable to DMP and a lesser part to DEP. However, their concentration levels are under-estimated since the total phthalate concentration does not consider DBP, DEHA and DEHP (*i.e.* the most abundant phthalates in plastic samples) because they are ubiquitous laboratory contaminants (Fankhauser-Noti and Grob, 2007). Comparing the concentrations of phthalates between leachates, about 12 to 21 times more phthalates were leached from new than from aged plastic gear after 24 h (6,681 and 539 ng L^{-1}, respectively) and 120 h (9,077 and 430 ng L^{-1}, respectively) incubation. Regarding the results of plastic screenings, phthalates were twice as abundant in new than in aged synthetic rope (282 and 108 µg g^{-1}, respectively), making a distinction between new and aged spat collectors (109 and 103 µg g^{-1}, respectively), suggesting a higher propensity for synthetic rope to leach into the surrounding environment. Similarly, the higher load of some PAHs and additives (DBP, DEHA and DEHP, Irgafos 168®) in the new synthetic rope compared with the aged one suggest a potential release of these compounds into seawater during their use in pearl-farming lagoons (Hermabessiere *et al.*, 2017). This trend is less obvious concerning spats collector. If we consider the difference in total additive concentration between new and

aged farming gear as relative to what is leached into the surrounding environment, we can consider an additive leaching of 6.3 µg g^{-1} and 184 µg g^{-1} from the spat collector and synthetic rope, respectively. This difference in leaching concentration highlights a difference in leaching properties of additives between the two main types of plastic used in pearl-farming, which is about 30 times greater from the synthetic rope (PE) than from the spat collector (PP). This divergence could be linked to the nature of polymer (H.-X. Li *et al.*, 2016) and to the types and concentrations of additives themselves varying between polymers and between plastic gears.

Further information on leaching properties was obtained from the assessment of leachates over time. Depending on the chemical compound, we generally quantified higher levels in leachates after 120 h than after 24 h incubation. For example, results obtained on new leachates revealed a DMP concentration from 5,000 to 7,500 ng L^{-1} in N-24 and N-120, respectively. Similarly, γ-HCH concentration in leachates from aged plastics varied from 2.2 to 29.7 ng L^{-1} in A-24 and A-120, respectively. For sorption of chemicals onto plastic, an increase over time was observed until equilibrium was reached at 24-48 h for some organic pollutants absorbed by PE floating in seawater (Bakir *et al.* 2014a). Other studies determined a longer period (from 200 h until more than 20 days) to reach equilibration for organic pollutants being absorbed by PE and PP (Karapanagioti and Klontza, 2008; Romera-Castillo *et al.*, 2018). In our study, increasing chemical concentrations according to the leaching time of plastic suggest an enhanced desorption specific to compounds and physico-chemical conditions (Bakir *et al.*, 2014b). It would be interesting to conduct further experiments to assess the concentration of chemicals over a longer period of time (weeks and months) and obtain a standard range of desorption of these gears.

Our chemical analyses support the complexity of studying the chemical aspects of plastic debris. Indeed, the composition of plastic products is generally unknown since polymer manufacturers are not required to disclose the ingredients of their products (Bolgar *et al.*, 2015). It is also challenging to determine an exhaustive plastic composition by current analytical methodologies to assess their presence and amounts within plastics and associated leachates (Bolgar *et al.*, 2015). Our work provides the first information about the chemical compounds associated with plastic gear used in pearl-farming, with 26 compounds identified as PAHs and additives, of which eight were leached, particularly phthalates. As with many plastic additives, phthalates are not chemically bonded to the polymer matrix and are, hence, easily dissolved in water (Clara *et al.*, 2010). Once released from the polymer matrix, phthalates and other identified chemicals may become available for uptake by living organisms and could cause a range of effects, such as endocrine disruption that may cause adverse reproductive and developmental effects (Teuten *et al.*, 2009; Hermabessiere *et al.*, 2017).

Plastic leachates impair embryo-larval development in the pearl oyster

Given these chemical analyses, it is likely that the observed toxicity may be a result of the interaction of contaminants present in a complex mixture of chemicals leached from plastic gear compared to the control (Teuten *et al.*, 2009; Engler, 2012). The high percentage of mortality (90-100%) occurring in embryos after 24 h exposure to leachates from new and aged farming gear at 100 g L^{-1} suggests a chemical toxicity of desorbed compounds. Embryo mortality was observed with the exposure of brown mussel embryos to leachate from beached pellets (0.2 ml of pellets ml^{-1}) up to 100% dead or abnormal embryos (Gandara e Silva *et al.*, 2016). In our data, significant sub-lethal effects appeared at lowest concentrations after 48 h exposure to N-24 (59% at 10 g L^{-1}) and N-120 (60-86% at all leachate concentrations), highlighting a higher toxicity from N-120 and more broadly from new plastic gear. This difference in toxicity between leachates from new and aged plastic could be discussed regards to the difference in phthalate concentrations (+6,142 and +8,647 ng L^{-1} in new plastic leachates after 24 h and 120 h incubation, respectively). Some studies that assessed the toxicity of leachates from new plastic materials to aquatic organisms (Lithner *et al.*, 2009, 2012; Nobre *et al.*, 2015; Bejgarn *et al.*, 2015; H.-X. Li *et al.*, 2016; Gandara e Silva *et al.*, 2016) corroborate the hypothesis that additives are responsible for the toxicity we observed on oyster embryo mortality. For example, Nobre *et al.* (2015) revealed higher anomalous embryonic development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to leachates from virgin pellets (66.5%) than from beached pellets (4.8%). An acute toxicity of leachates from 11 newly bought plastic products was also demonstrated on *D. magna*, causing mortality with a 48 h EC_{50} ranging from 2 to 235 g plastic L^{-1} (Lithner *et al.*, 2012). Although the marked difference in toxicity between new and aged plastic leachates was likely caused by additives from the new plastic gear, toxicity occurred in both types of plastic leachates and seems to be linked to specific compounds. Indeed, significant impairment of *P. margaritifera* embryo-larval development was observed in A-24 and A-120 at 100 g L^{-1} compared with the control (no effect), while the latter had a concentration of phthalates five times higher (*i.e.* 2,314 ng L^{-1}) than in A-24 and A-120 (539 and 430 ng L^{-1}, respectively). This suggests that (1) such a concentration of phthalates does not necessarily lead to toxic effects (at least here for the pearl oyster early life stages) and/or (2) that other compounds (either as additives or adsorbed chemicals) are responsible for the observed toxicity.

Toxicity from new plastic leachates is likely due to plastic additives, as these plastic gears had not been exposed to potential contaminants *in situ,* in contrast to the aged ones. For the aged gears, the toxicity of their leachates seems to be linked to absorbed PAHs and pesticides from the environment. Toxic compounds, such as BaP, chrysene, σ- and γ-HCH, chlorpyrifos and σ-endosulfan (Fitzhugh *et al.*, 1964; Paul *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2017; Kopjar *et al.*, 2018), were present in smaller quantities, down to completely absent, in the control and leachates

obtained from new plastics compared to aged ones. For example, BaP is a priority pollutant (UE, 2008; US EPA, 2014) used as a reference PAH in ecotoxicology (Banni *et al.*, 2017). BaP can be found throughout the marine environment and has been reported to cause oxidative stress, endocrine disruption and genotoxic effects in mussels (Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003; Banni *et al.*, 2017). Furthermore, Sauter and Steele (1972) also demonstrated that γ-HCH (1.0 and 10 ppm in feed), a widely used organochlorine pesticide, significantly reduced hatchability, egg shell thickness and production, and increased embryonic mortality in the chicken. Thus, the presence of BaP and HCHs in aged plastic leachates may have, among other contaminants, contributed to the alteration of the embryo-larval development in the pearl oyster. However, HCHs were also reported to have hormesis effect, as demonstrated with α-HCH (a biproduct in the manufacture of γ-HCH), when given at a low dose can protect against DNA damage and cytotoxic effects induced by subsequent exposures at a much higher dose (Fukushima *et al.*, 2005). The theory of hormesis has been defined as a dose-response relationship in which there is biological activation at low doses but an inhibition at high doses, and *vice-versa* (Calabrese, 2002). Interestingly, the presence of γ-HCH in aged leachates (ranging from 2.2 to 29.7 ng L^{-1}), especially in A-120 (20 times greater than N-24 and N-120), could have led to hormesis-type effect on embryo development as observed with complex variation between conditions, slightly higher in aged (91-97% from both A-24 and A-120) than in new (62-82% from both N-24 and N-120) plastic leachates (at 0.1, 1 and 10 g L^{-1}), the control being intermediate (83%). This trend is similar to the *in vitro* embryo development in mouse showing a slightly higher number of intact embryos and blastocystes after an exposition to γ-HCH at 3.6 µg ml^{-1} compared to control before a significant dose-dependent decrease at 7.2, 14.5 and 29 µg ml^{-1} (Alm *et al.*, 1996). In our study, this hormesis hypothesis may explain the rapid development of trocophore larvae to D-stage occurred in A-120 at 100 g L^{-1}.

Furthermore, the polymer nature of plastic gear also seems to play an important role in the toxicity we observed and has been demonstrated in previous studies. Lithner *et al.* (2012) observed that leachate from new consumer products made of PP showed no toxicity to *D. magna*, while leachate from PE gear appeared toxic (48 h EC_{50} at 17-24 g of plastic L^{-1}). Similarly, H.-X. Li *et al.* (2016) observed that the leachates from PP showed low toxicity to the barnacle *A. amphitrite* with a low effect on both larval survival (87-97%) and settlement (10-28%), but PE was more toxic (77-96% and 0-4%, respectively) to this species. In our study, synthetic rope made of PE and additives measured in leachates that seemed essentially to be coming from it could be the major source of the toxicity we observed. It would therefore be interesting to further assess the toxicity of leachates from synthetic rope (PE) and spat collector (PP), separately, so as to be able to dissociate the toxicities associated to each plastic type. Overall, toxicity assessment could be improved by individually testing identified chemicals at the measured concentrations on pearl oyster embryos in order to be able to dissociate singular implication of analytes in the toxicity we

observed. Types of gear and polymer play therefore a major role in toxicity demphasizing the needs of testing plastics that animals mostly encounter in the wild as we did here.

Environmental implications in pearl-farming lagoons

Our work adds further information to the growing literature on the toxicity of plastics to aquatic organisms, especially through their associated leachates dissolved in seawater. We demonstrated experimentally that plastic pearl-farming gear can impair embryonic development in the pearl oyster, and it should be considered in an environmental context that synthetic ropes and spat collectors come into close contact with early life stage of *P. margaritifera*. As a consequence of plastic accumulation in pearl-farming lagoons, leaching chemicals, especially additives, could represent an increasing ecotoxicological risk for marine organisms (Hermabessiere *et al.*, 2017). Although much higher desorption times are expected for plastic farming gear in farming atolls, this *in vitro* study revealed high toxicity of leachates from both new and aged farming gears on embryo-larval development of *P. margaratifera*. As higher leaching times may likely release wider variety and higher quantity of toxic chemicals at least for aged platics, there is a need to assess deeply effects and extend this question to productive Polynesian lagoons. Therefore, even if chemical analyses and concentrations of leachates tested may be difficult to interpret from an ecological point of view, the screening of plastics provides relevant toxicity information. Considering the very limited concentrations of phthalates in aged plastic leachates and the relatively short time of desorption tested here, our study shows their non-covalent association with the polymer matrix and therefore their potentially important desorption into seawater and natural environment. In the Venda region of South Africa, it was shown that plastic pollution caused river water pollution by phthalates at levels ranging from 0.16 to 10.17 mg L^{-1} (Fatoki *et al.*, 2010). Given the increase of both operational and derelict farming gear in pearl-farming lagoons, their accumulation could lead to a significant contamination by additives, including phthalates. Considering a 200-m long collecting station (rearing line) composed of spat collectors (39 kg) and synthetic ropes (135 kg), our estimated leaching of phthalates (*i.e.* 6.3 µg g^{-1} and 184 µg g^{-1}, respectively) can hypothesized that a collecting station may release, at least, 25 g of phthalates during its use (about 3 to 5 years). Indeed, it would have been relevant to know the age of the aged plastics used here to refine this estimate, the curve of desorption over time, and the environmental factors knowing that aging is driven by many environmental factors. Extrapolating these data to the semi-enclosed lagoon of Takapoto (14°37′39″S, 145°12′18″W, FP) containing approximately 562 tons of rearing lines, may represent 80 kg of potentially leached and/or leachable phthalates (excluding leaching from other plastic gear such as buoys, nylon ties, grids and baskets), *i.e.* a phthalates contamination of 60 ng L^{-1}, considering the volume of the lagoon (*i.e.* 1.4 km^3; Rougerie, 1979). Compared to our experiment, this overall

assessment would amount to a mean leachate concentration ranging from 0.1 to 1 g L^{-1}. However, the toxic hazard associated with the leaching of phthalates should be considered contaminated hotspots. Indeed, despite progressive leaching, seawater dilution and potential photo- and biodegradation over time on the lagoon scale, future research should perform chemical analyses of *in situ* seawater (using passive sensors to identify chronic contamination in a relevant and practical way) and test if accumulation areas of derelict plastic gear and rearing areas are becoming hotspots of phthalate desorption. Our results wholly suggest that the plastic gear used in the pearl-farming industry could release significant amounts of hazardous chemicals that may affect steps of pearl oyster reproduction, especially oyster spat settlement.

Conclusion

This *in vitro* study shows that *P. margaritifera* embryo-larval development is affected by plastic leachates obtained from plastic pearl-farming gear that are closely interrelated with the early life stages of the pearl oyster. Operational and derelict areas of pearl-farming activity might be hotspots of chemicals raising the question of *in situ* effects on cultivated oysters and other organisms. On a more global scale, the present study may alarm on the possible deleterious effects of aquaculture and fishing gears on marine life, highlighting the need to give greater consideration to the end-of-life of plastic materials used at sea. It represents a preliminary step to evaluate the impact of MPs from plastic pearl-farming gear on the pearl oyster, considering the biological changes caused by the MPs *per se*, chemicals incorporated into/onto the MPs, or both.

Supplementary information

The SI contains the polymer identification of plastic pearl-farming gear by FTIR spectroscopy (**Figure S1**); PAHs distribution in plastic samples (**Figure S2**) and their relative abundance according to chemical analyses performed by TD-GC/MS and SLE-GC/MS methods (raw data) (**Table S1**); additive concentrations in plastic samples (**Figure S3**) and corresponding raw data following chemical analyses by TD-GC/MS method (**Table S2**); chemical compounds identified and quantified in 24 h and 120 h leachates from new and aged plastic pearl-farming gear by SBSE-TD-GC/MS (raw data) (**Table S3**); mortality data after 24 h and 48 h exposure to leachates from new and aged plastic gear (**Table S4**); results of Tukey's post-hoc test performed on mortality data (24 h and 48 h) square root transformed (**Table S5**); percentage of embryonic development after 24 h exposure to leachates from new and aged plastic gear (**Table S6**); results of Tukey's post-hoc test performed on embryo development data square root transformed (**Table S7**); larval stages after 24 h exposure to leachates from new and aged plastic gear (**Table S8**);

results of Tukey's post-hoc test performed on larval stages (24 h) square root transformed (**Table S9**); larval stages after 48 h exposure to leachates from new and aged plastic gear (**Table S10**) and results of Tukey's post-hoc test performed on larval stages (48 h) square root transformed (**Table S11**).

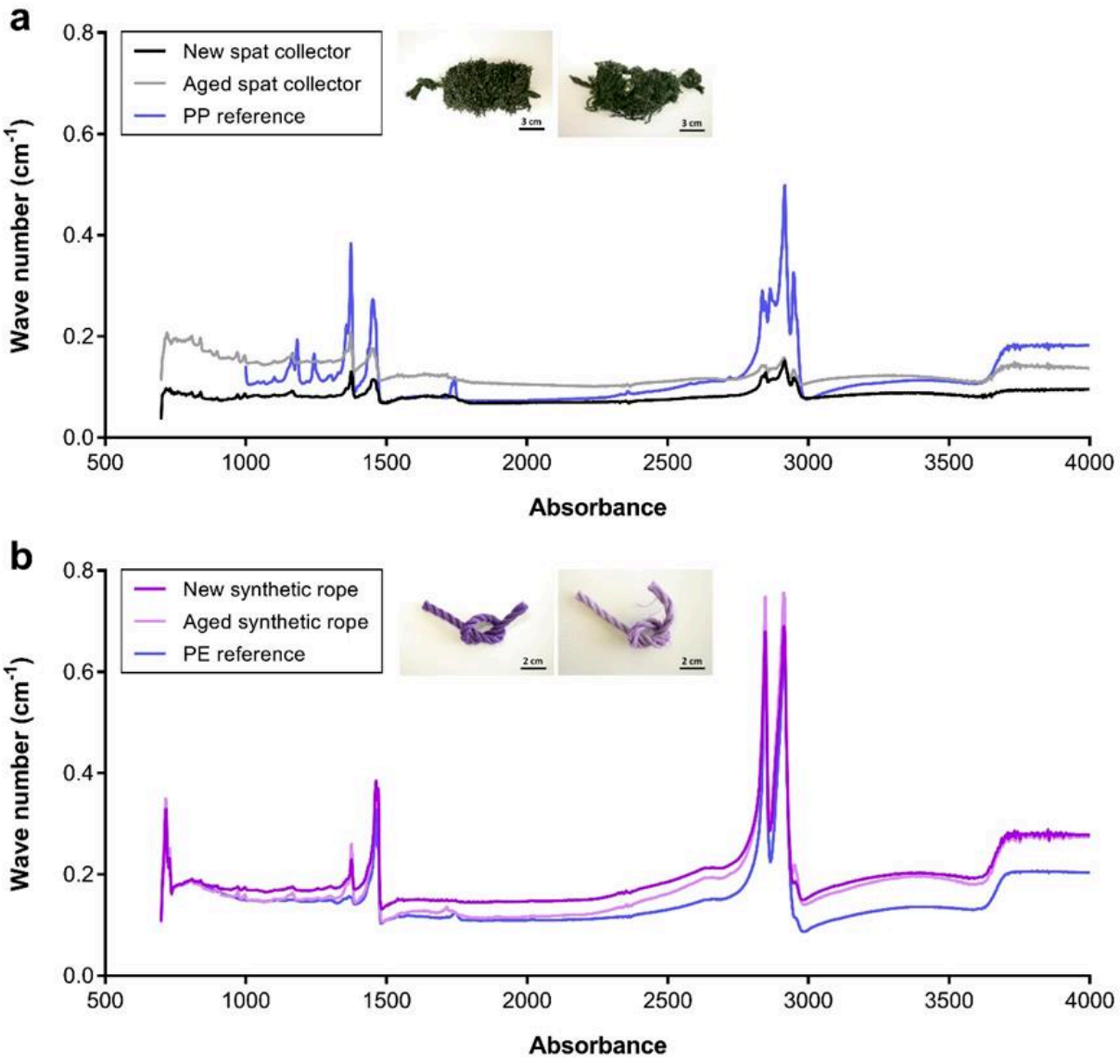


Figure S1. Polymer identification of plastic pearl-farming gear by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Polypropylene (PP) identification from new and aged spat collectors (**a**), and polyethylene (PE) identification from new and aged synthetic rope lines (**b**).

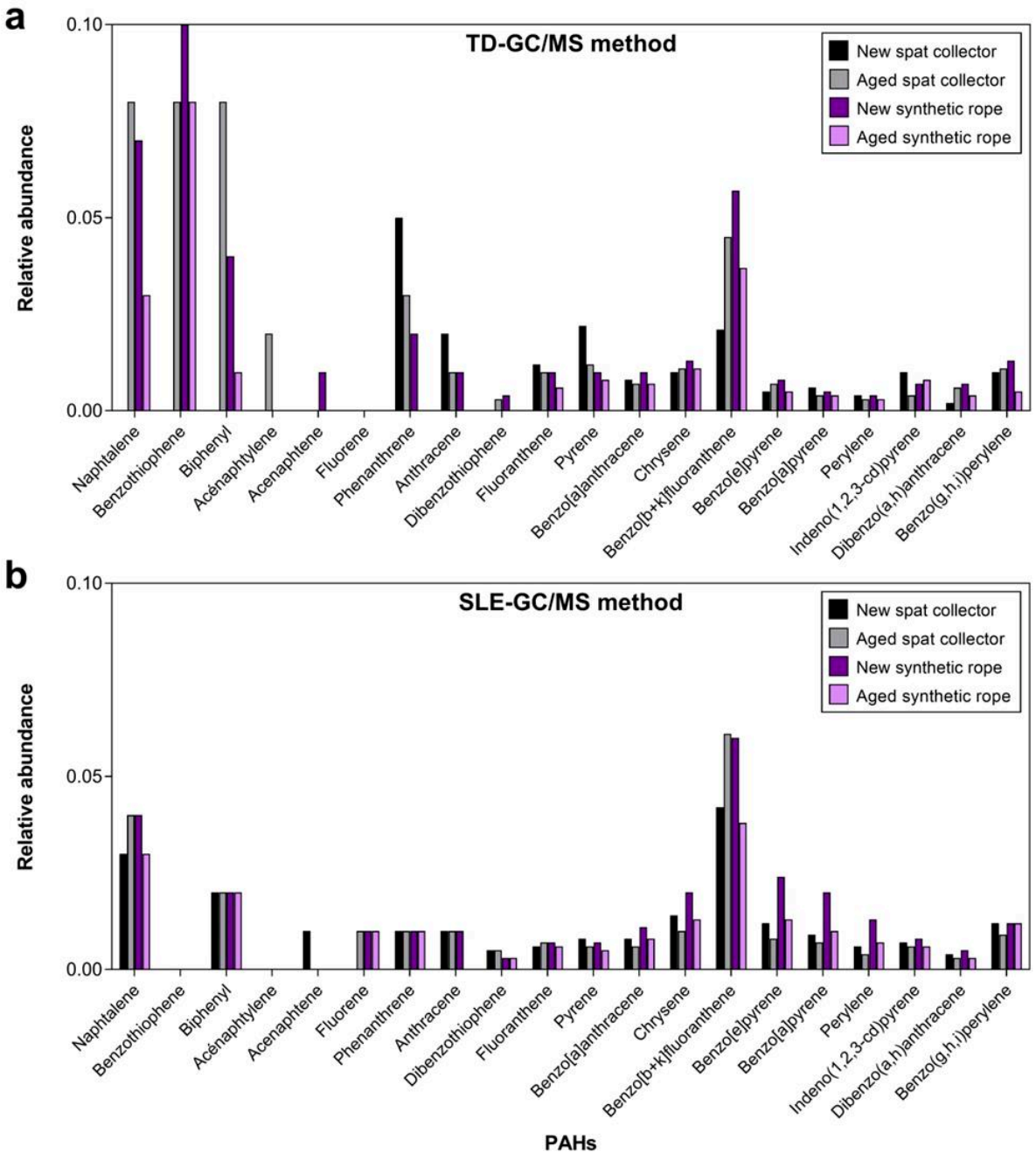


Figure S2. Distribution of PAHs in plastic samples. Chemical analyses performed by TD-DC/MS (**a**) and SLE-GC/MS (**b**) method.

Table S1. Relative abundance of PAHs in plastic samples according to chemical analyses performed by TD-GC/MS and SLE-GC/MS methods.

Relative abundance		**TD-GC/MS method**				**SLE - GC/MS method**			
PAHs	**Ion**	**New spat collector**	**Aged spat collector**	**New synthetic rope**	**Aged synthetic rope**	**New spat collector**	**Aged spat collector**	**New synthetic rope**	**Aged synthetic rope**
Naphtalene	128	0.00	0.08	0.07	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03
Benzothiophene	134	0.00	0.08	0.10	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Biphenyl	154	0.00	0.08	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
Acenaphtylene	152	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acenaphtene	154	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Fluorene	166	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
Phenanthrene	178	0.05	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
Anthracene	178	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00
Dibenzothiophene	184	0.000	0.003	0.004	0.000	0.005	0.005	0.003	0.003
Fluoranthene	202	0.012	0.010	0.010	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006
Pyrene	202	0.022	0.012	0.010	0.008	0.008	0.006	0.007	0.005
Benzo[a]anthracene	228	0.008	0.007	0.010	0.007	0.008	0.006	0.011	0.008
Chrysene	228	0.010	0.011	0.013	0.011	0.014	0.010	0.020	0.013
Benzo[b+k]fluoranthene	252	0.021	0.045	0.057	0.037	0.042	0.061	0.060	0.038
Benzo[e]pyrene	252	0.005	0.007	0.008	0.005	0.012	0.008	0.024	0.013
Benzo[a]pyrene	252	0.006	0.004	0.005	0.004	0.009	0.007	0.020	0.010
Perylene	252	0.004	0.003	0.004	0.003	0.006	0.004	0.013	0.007
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	276	0.010	0.004	0.007	0.008	0.007	0.006	0.008	0.006
Dibenzo(a,h)anthracene	278	0.002	0.006	0.007	0.004	0.004	0.003	0.005	0.003
Benzo(g,h,i)perylene	276	0.010	0.011	0.013	0.005	0.012	0.009	0.012	0.012
∑ PAHs		**0.18**	**0.17**	**0.18**	**0.10**	**0.15**	**0.15**	**0.21**	**0.14**

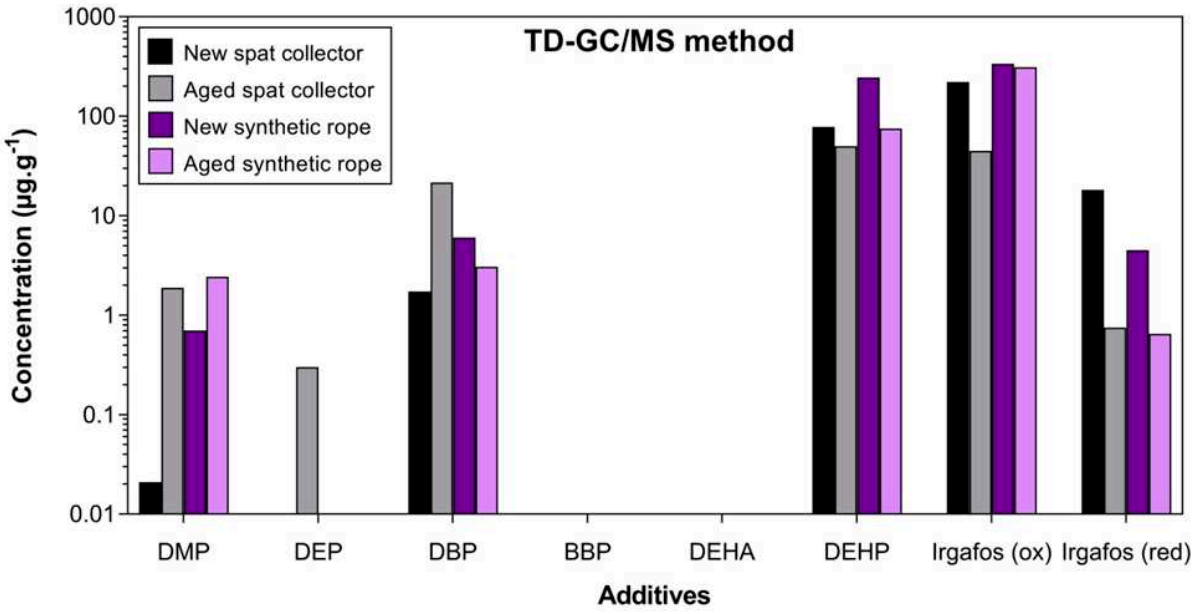


Figure S3. Additive concentrations in plastic samples (after blank correction). Chemical analyses performed by TD-DC/MS method. Phthalate additives: DMP (dimethyl phthalate), DEP (diethyl phthalate), DBP (di-n-butyl phthalate), BBP (butyl benzyl phthalate), DEHA (diethylhexyl adipate) and DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate). Antioxidant additives: Irgafos 168® oxidized (ox) and reduced (red).

Table S2. Additive concentrations in plastic samples according to chemical analyses performed by TD-GC/MS method (raw data).

Concentration (µg g^{-1})		**TD-GC/MS method**				
Additives	**Ion**	**Blank**	**New spat collector**	**Aged spat collector**	**New synthetic rope**	**Aged synthetic rope**
DMP	163	0.04	0.25	1.92	0.74	2.48
DEP	177	0.67	0.01	0.97	0.27	0.10
DBP	149	1.20	2.93	22.75	7.24	4.26
DEHA	129	8.08	7.59	6.92	7.91	5.63
DEHP	149	20.13	98.31	70.26	265.50	95.51
Irgafos 168® oxidized	316	1.37	222.57	46.18	337.88	313.20
Irgafos 168® reduced	441	0.04	18.25	0.79	4.53	0.69
∑ Additives		**30.1**	**109.1**	**102.8**	**281.7**	**108.0**

DMP: dimethyl phthalate, DEP: diethyl phthalate, DBP: di-n-butyl phthalate, BBP: butyl benzyl phthalate, DEHA: diethylhexyl adipate and DEHP: di(2-ethylhexyl) phthalate.

Table S3. Chemical compounds identified and quantified in 24 h and 120 h leachates from new and aged plastic pearl-farming gear by SBSE-TD-GC/MS (raw data).

DL (ng L^{-1})	QL (ng L^{-1})	Compounds*	Blank	Control	New leachate		Aged leachate	
			(ng L^{-1})	(ng L^{-1})	24 h (ng L^{-1})	120 h (ng L^{-1})	24 h (ng L^{-1})	120 h (ng L^{-1})
0.30	1.00	Fluorene	<DL	1.63	<QL	<QL	<DL	<DL
0.30	1.00	Phenanthrene	<DL	2.12	1.44	2.20	1.75	2.19
0.30	1.00	Fluoranthene	<QL	2.63	9.40	2.48	3.69	4.39
0.15	0.50	Chrysene	<DL	<DL	<DL	<DL	<QL	0.77
0.15	0.50	Benzo[a]pyrene	<QL	<DL	<DL	<DL	<DL	0.54
		∑ PAHs	**0.00**	**6.39**	**10.85**	**4.68**	**5.45**	**7.90**
0.15	0.50	PCB 28	<DL	<DL	2.25	<DL	<DL	<DL
		∑ PCBs	**0.00**	**0.00**	**2.25**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
0.15	0.50	α -HCH	<DL	0.95	<DL	<DL	<DL	2.36
0.15	0.50	β -HCH	<DL	2.15	<QL	<QL	<DL	<DL
0.15	0.50	γ -HCH	<DL	1.63	1.38	1.66	2.17	29.70
0.15	0.50	δ- HCH	<DL	1.70	<DL	<DL	<DL	<DL
0.15	0.50	Acetochlore	<DL	2.41	1.48	2.14	<QL	<QL
0.15	0.50	Methylparathion	<DL	1.79	2.78	<DL	<DL	1.40
0.15	0.50	Alachlore	<DL	1.72	<DL	<DL	<DL	<DL
0.15	0.50	Chlorpyrifos	<DL	<QL	1.54	1.86	2.68	4.71
0.15	0.50	Chlorfenvinphos	<DL	6.53	<DL	<DL	<DL	<DL
0.03	0.10	α -Endosulfan	<QL	0.16	0.37	0.36	0.30	0.81
0.15	0.50	Dieldrin	<DL	0.61	<QL	<QL	2.16	1.66
0.30	1.00	Endosulfan sulfate	<DL	2.04	<DL	<DL	<QL	<DL
		∑ Pesticides	**0.00**	**21.69**	**7.55**	**6.02**	**7.31**	**40.64**
0.45	1.50	BDE 47	<QL	2.45	<QL	<QL	<QL	<QL
		∑ PBDEs	**0.00**	**2.45**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
15.00	50.00	DMP	<DL	1504.79	4939.96	7457.86	135.78	<QL
15.00	50.00	DEP	<QL	339.34	1740.96	1619.14	403.17	429.75
15.00	50.00	BBP	<QL	470.06	<QL	<DL	<DL	<DL
		∑ Phthalates	**0.00**	**2314.19**	**6680.92**	**9077.00**	**538.95**	**429.75**

DL: detection limit, QL: quantification limit, PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons, PCBs: polychlorinated biphenyls, HCH: Hexachlorocyclohexane, PBDEs: polybrominated diphenyl ethers, DMP: dimethyl phthalate, DEP: diethyl phthalate, BBP: butyl benzyl phthalate.

* Compounds annotated "< DL" and/or "< QL" for all screened treatments are not included in the table.

Table S4. Mortality after 24 h and 48 h exposure to leachates from new and aged plastic gear.

Leachate concentration (g L^{-1})	**Control** (%)	**New 24 h leachate** (%)	**Aged 24 h leachate** (%)	**New 120 h leachate** (%)	**Aged 120 h leachate** (%)
24 h					
0	18.3 ± 11.1				
0.1		26.1 ± 17.7	11.5 ± 11.8	39.6 ± 12.0	8.6 ± 6.3
1		21.5 ± 14.5	8.7 ± 9.1	32.8 ± 16.07	12.0 ± 15.9
10		26.8 ± 16.9	10.5 ± 8.6	19.2 ± 5.8	3.6 ± 3.4
100		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	90.1 ± 3.0
48 h					
0	10.0 ± 13.8				
0.1		26.3 ± 13.3	17.5 ± 25.0	85.9 ± 3.0	28.5 ± 23.4
1		44.8 ± 38.3	16.4 ± 15.0	65.7 ± 24.5	20.8 ± 23.5
10		58.8 ± 30.8	12.2 ± 11.4	59.5 ± 19.9	10.5 ± 14.1
100		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	93.8 ± 4.6

Values resulting from the average of five replicates (mean ± standard deviation).

Table S5. Results of Tukey's post-hoc test performed on mortality data (24 h and 48 h) square root transformed.

		Control	New 24 h leachate				Aged 24 h leachate				New 120 h leachate				Aged 120 h leachate				*Group*
	g L^{-1}	0	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	
24 h																			
Control	**0**																		*abc*
	0.1	-																	*abc*
N-24	**1**	-	-																*abc*
	10	-	-	-															*abc*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001														*d*
	0.1	-	-	-	-	<0.001													*ab*
A-24	**1**	-	-	-	-	<0.001	-												*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-											*ab*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001										*d*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	0.0221	0.0060	0.0157	<0.001									*c*
N-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-								*bc*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-							*abc*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001						*d*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0066	-	-	<0.001					*ab*
A-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0286	0.0104	-	<0.001	-				*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	<0.001	-	-	<0.001	-	-			*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001		*d*
48 h																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*abc*
N-24	**1**	-	-																*abcd*
	10	0.0064	-	-															*bcde*
	100	<0.001	<0.001	0.0013	0.0087														*f*
	0.1	-	-	-	-	<0.001													*ab*
A-24	**1**	-	-	-	-	<0.001	-												*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-											*ab*
	100	<0.001	<0.001	0.0103	-	-	<0.001	<0.001	<0.001										*ef*
	0.1	<0.001	0.0249	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001	-									*def*
N-120	**1**	<0.001	-	-	-	-	0.0328	0.0472	0.0191	-	-								*cdef*
	10	0.0034	-	-	-	0.0145	-	-	-	-	-	-							*bcde*
	100	<0.001	<0.001	0.0013	0.0087	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	-	-	0.0145						*f*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0165	-	-	<0.001					*abc*
A-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0024	-	-	<0.001	-				*abc*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	<0.001	0.0174	-	<0.001	-	-			*ab*
	100	<0.001	0.0013	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	-	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001		*def*

P-value of significant differences between treatments are expressed ($p < 0.05$) and non-significant values ($p \geq 0.05$) are noted "-".

Table S6. Percentage of embryonic development after 24 h exposure to leachates from new and aged plastic gear.

Leachate concentration (g L^{-1})	Control (%)	New 24 h leachate (%)	Aged 24 h leachate (%)	New 120 h leachate (%)	Aged 120 h leachate (%)
0	82.9 ± 11.3				
0.1		74.4 ± 17.3	95.6 ± 16.3	61.9 ± 11.7	96.3 ± 7.1
1		79.7 ± 14.2	96.2 ± 10.9	68.1 ± 16.0	91.2 ± 15.8
10		74.8 ± 16.5	92.7 ± 10.3	81.9 ± 6.1	97.3 ± 3.1
100		44.7 ± 6.8	30.3 ± 14.9	22.4 ± 2.9	44.9 ± 12.4

Values resulting from the average of five replicates (mean ± standard deviation).

Table S7. Results of Tukey's post-hoc test performed on embryo development data square root transformed.

		Control	New 24 h leachate				Aged 24 h leachate				New 120 h leachate				Aged 120 h leachate				*Group*
	g L^{-1}	**0**	**0.1**	**1**	**10**	**100**	**0.1**	**1**	**10**	**100**	**0.1**	**1**	**10**	**100**	**0.1**	**1**	**10**	**100**	
Control	**0**																		*abc*
N-24	**0.1**	-																	*abcd*
	1	-	-																*abcd*
	10	-	-	-															*abcd*
	100	0.0041	-	-	-														*def*
A-24	**0.1**	-	-	-	-	<0.001													*ab*
	1	-	-	-	-	<0.001	-												*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-											*ab*
	100	<0.001	0.0064	<0.001	0.0051	-	<0.001	<0.001	<0.001										*ef*
N-120	**0.1**	-	-	-	-	-	0.0493	0.0099	0.0311	-									*cdef*
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								*bcde*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.001	-	0.0148							*abcd*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-		0.0062	<0.001						*f*
A-120	**0.1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0073	-	-	<0.001					*ab*
	1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0303	-	-	<0.001	-				*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	0.0014	-	-	<0.001	-	-			*a*
	100	0.0043	-	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	-	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001		*def*

P-value of significant differences between treatments are expressed ($p < 0.05$) and non-significant values ($p \geq 0.05$) are noted "**-**".

Table S8. Larval stages after 24 h exposure to leachates from new and aged plastic gear.

Leachate concentration (g L^{-1})	**Control** (%)	**New 24 h leachate** (%)	**Aged 24 h leachate** (%)	**New 120 h leachate** (%)	**Aged 120 h leachate** (%)
Trocophore larvae					
0	1.4 ± 1.1				
0.1		0.9 ± 1.2	2.7 ± 2.6	2.5 ± 2.0	3.2 ± 2.0
1		1.4 ± 1.0	3.6 ± 3.1	1.1 ± 1.4	2.1 ± 0.8
10		1.0 ± 1.5	2.5 ± 1.7	0.6 ± 0.9	0.4 ± 0.5
100		99.6 ± 0.8	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	61.7 ± 9.5
D-stage larvae					
0	98.5 ± 1.1				
0.1		99.1 ± 1.2	96.6 ± 2.1	97.5 ± 2.0	95.1 ± 2.0
1		98.3 ± 1.3	96.6 ± 2.1	98.6 ± 1.3	96.3 ± 2.3
10		97.6 ± 2.0	97.1 ± 1.6	98.7 ± 1.2	99.1 ± 1.6
100		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	22.9 ± 7.3
Dead larvae					
0	0.1 ± 0.3				
0.1		0.0 ± 0.0	0.7 ± 1.1	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.9
1		0.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	1.7 ± 1.6
10		1.4 ± 1.7	0.4 ± 0.5	0.7 ± 1.0	0.6 ± 1.2
100		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.4 ± 9.2

Values resulting from the average of five replicates (mean ± standard deviation).

Table S9. Results of Tukey's post-hoc test performed on larval stages (24 h) square root transformed.

		Control	New 24 h leachate				Aged 24 h leachate				New 120 h leachate				Aged 120 h leachate				Group
	g L^{-1}	0	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	
Trocophore larvae																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*a*
N-24	**1**	-	-																*a*
	10	-	-	-															*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001														*c*
	0.1	-	-	-	-	<0.001													*a*
A-24	**1**	-	-	-	-	<0.001	-												*a*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-											*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001										*c*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001									*a*
N-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-								*a*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-							*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001						*c*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001					*a*
A-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-				*a*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-			*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		*b*
D-stage larvae																			
Control	**0**																		*ab*
	0.1	-																	*a*
N-24	**1**	-	-																*ab*
	10	-	-	-															*ab*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001														*d*
	0.1	-	-	-	-	<0.001													*ab*
A-24	**1**	-	-	-	-	<0.001	-												*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-											*ab*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001										*d*
	0.1	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001									*ab*
N-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-								*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-							*ab*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001						*d*
	0.1	-	0.0499	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001					*b*
A-120	**1**	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-				*ab*
	10	-	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-			*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		*c*
Dead larvae																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*a*
N-24	**1**	-	-																*a*
	10	-	-	-															*ab*
	100	-	-	-	-														*ab*

A-24	**0.1**	-	-	-	-	-												*ab*
	1	-	-	-	-	-	-											*a*
	10	-	-	-	-	-	-	-										*ab*
	100	-	-	-	-	-	-	-	-									*a*
N-120	**0.1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-								*a*
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							*a*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						*ab*
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					*a*
A-120	**0.1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				*ab*
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			*ab*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		*ab*
	100	<0.001	0.0039	0.0460	-	-	-	0.0039	-	0.0039	0.0039	0.0487	-	0.0039	-	-	-	*b*

P-value of significant differences between treatments are expressed ($p < 0.05$) and non-significant values ($p \geq 0.05$) are noted "**-**".

Table S10. Larval stages after 48 h exposure to leachates from new and aged plastic gear.

Leachate concentration (g L^{-1})	**Control** (%)	**New 24 h leachate** (%)	**Aged 24 h leachate** (%)	**New 120 h leachate** (%)	**Aged 120 h leachate** (%)
Trocophore larvae					
0	0.0 ± 0.0				
0.1		0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
1		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
100		100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100. 0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D-stage larvae					
0	99.3 ± 0.6				
0.1		99.2 ± 0.8	92.3 ± 4.7	24.3 ± 11.4	89.7 ± 5.3
1		63.7 ± 37.7	93.8 ± 2.4	46.3 ± 26.2	88.8 ± 4.4
10		48.7 ± 28.2	96.7 ± 3.4	55.7 ± 20.8	87.7 ± 11.3
100		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	18.7 ± 12.5
Dead larvae					
0	0.7 ± 0.6				
0.1		0.8 ± 0.8	7.0 ± 5.0	75.7 ± 11.4	10.3 ± 5.3
1		36.3 ± 37.7	6.2 ± 2.4	53.7 ± 26.2	11.2 ± 4.4
10		51.3 ± 28.2	3.3 ± 3.4	44.3 ± 20.8	12.3 ± 11.3
100		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	81.3 ± 12.5

Values resulting from the average of five replicates (mean ± standard deviation).

Table S11. Results of Tukey's post-hoc test performed on larval stages (48 h) square root transformed.

		Control	New 24 h leachate				Aged 24 h leachate				New 120 h leachate				Aged 120 h leachate				Group
	g L^{-1}	0	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	
Trocophore larvae																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*a*
N-24	**1**	-	-																*a*
	10	-	-	-															*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001														*c*
	0.1	<0.001	0.0013	0.0030	0.0013	<0.001													*b*
A-24	**1**	-	-	-	-	-	0.0013												*a*
	10	-	-	-	-	-	0.0013	-											*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	-										*c*
	0.1	-	-	-	-	-	0.0013	-	-	-									*a*
N-120	**1**	-	-	-	-	-	0.0013	-	-	-	-								*a*
	10	-	-	-	-		0.0013	-	-	-	-	-							*a*
	100	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001						*c*
	0.1	-	-	-	-	-	0.0013	-	-	-	-	-	-	<0.001					*a*
A-120	**1**	-	-	-	-	-	0.0013	-	-	-	-	-	-	<0.001	-				*a*
	10	-	-	-	-	-	0.0030	-	-	-	-	-	-	<0.001	-	-			*a*
	100	-	-	-	-	<0.001	0.0013	-	-	<0.001	-	-	-	<0.001	-	-	-		*a*
D-stage larvae																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*ab*
N-24	**1**	-	-																*abcd*
	10	-	-	-															*abcd*
	100	<0.001	0.0015	-	-														*d*
	0.1	-	-	-	-	-													*abcd*
A-24	**1**	-	-	-	-	-	-												*abcd*
	10	-	-	-	-	0.0133	-	-											*abc*
	100	0.0020	0.0186	-	-	-	-	-	-										*d*
	0.1	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	-									*bcd*
N-120	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								*abcd*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							*abcd*
	100	<0.001	0.0015	-	-	-	-	-	0.0133	-	-	-	-						*d*
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					*abcd*
A-120	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				*abcd*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			*abcd*
	100	0.0022	0.0387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		*cd*
Dead larvae																			
Control	**0**																		*a*
	0.1	-																	*ab*
N-24	**1**	-	-																*abc*
	10	-	-	-															*abc*
	100	-	-	-	-														*a*

A-24	**0.1**	-	-	-	-	-													*abc*
	1	-	-	-	-	-	-												*abc*
	10	-	-	-	-	-	-	-											*abc*
	100	-	-	-	-	-	-	-	-										*bc*
N-120	**0.1**	0.0021	0.0364	-	-	0.0022	-	-	-	0.0254									*c*
	1	0.0424	-	-	-	0.0306	-	-	-	-	-								*abc*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							*abc*
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0022	0.0306	-						*a*
A-120	**0.1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					*abc*
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				*abc*
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			*abc*
	100	<0.001	0.0189	-	-	0.0010	-	-	-	0.0142	-	-	-	0.0010	-	-	-		*c*

P-value of significant differences between treatments are expressed ($p < 0.05$) and non-significant values ($p \geq 0.05$) are noted "**-**".

3. Article 5 (en rédaction) – *Analytical Methods*

The real challenge of producing more realistic microplastics to conduct relevant ecotoxicological experiments

Tony Gardon [a, *], Fabienne Lagarde [b], Ika Paul-Pont [b], Claude Soyez [a], Gilles Le Moullac [a], Arnaud Huvet [b]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F-98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Institut des Molécules et des Matériaux du Mans, UMR CNRS 6283, Le Mans Université, Le Mans, France

[c] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

* *Corresponding author*

Abstract

An innovative microplastics (MP) production methodology was performed in order to make future ecotoxicological experiments in more realistic scenarios. The methodology was based on a mechanical cryogenic grinding of plastic pearl-farming gears followed by several liquid sieving. Desired size range (20 to 60 µm) was selected to fit the range of particles size ingested by our biological model, the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Plastic gears were those that *P. margaritifera* encountered in its surrounding environment, in pearl-farming lagoons of French Polynesia. In first place, we emphasized the importance to adapt grinding time to plastic types by carrying out quantitative and quality assessments of the expected MP fractions. The effectiveness of the protocol was demonstrated by obtaining a peak in the number of MP included in the desired size range (*i.e.* 8 to 60 µm). However, this peak was flattened by the high quantity of particles < 2.6 µm (~ 50% of the pseudo-MP 20-60 µm fraction). Indeed, diverging results were obtained between sieving range and particles size distribution. Size and microstructure characterization highlighted particles self-assembly at the origin of the divergence we observed. Overall, our results underlined this physical problem as a technical lock asking for further investigations and the special need to systematically characterize MP size distribution used for ecotoxicological experiments.

Introduction

Microplastic particles (MP, < 5 mm) are the most numerically abundant form of solid waste on Earth (Eriksen *et al.*, 2014). During the past fifteen years, scientific community gave due consideration to this global concern by evaluating environmental concentrations in different domains of the marine system (Eriksen *et al.*, 2014; Cózar *et al.*, 2014; Woodall *et al.*, 2014; van Sebille *et al.*, 2015), and the adverse effects on aquatic organisms in laboratory conditions (*e.g.* Cole *et al.*, 2013, 2015; Lee *et al.*, 2013; Besseling *et al.*, 2014; Sussarellu *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2016; Gardon *et al.*, 2018). However, the vast majority of these laboratory experiments, which conducted experimental exposures to microplastics, commonly used a single polymer type with spherical shape (*i.e.* microbeads) and particle concentrations that are higher (in number of particles per volume), than those found in the field (Phuong *et al.*, 2016; Lenz *et al.*, 2016). For most of them, mass concentration was in the range of the estimated field concentrations for biggest particles (> 333 µm) (Lenz *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2018). But, the actual *in situ* exposure conditions are more complex (*i.e.* various particle shapes, sizes, polymer types, surface characteristics and chemical composition) (Phuong *et al.*, 2016; Lambert *et al.*, 2017), with influencing synergic factors (*e.g.* physical effects, chemical toxicity, associated (micro)biota, etc.) (Engler, 2012; Reisser *et al.*, 2014; Syberg *et al.*, 2015; Pittura *et al.*, 2018), which made of MP, an overall risk data-demanding for risks assessment (Koelmans *et al.*, 2017). Despite this divergence, the number of papers is still growing but knowledge is not growing at the same rate due to redundancy in studies. The gap between potential risks and the actual risks remain concrete within sight of lack of relevance in ecological terms (Lenz *et al.*, 2016; Koelmans *et al.*, 2017; Horton *et al.*, 2017; Connors *et al.*, 2017). Moreover, recent studies highlighted the interest to work with materials that are as close as possible than those found *in situ,* by demonstrating the characteristics differences between weathered plastic materials and new ones or virgin plastics (*e.g.* Song *et al.*, 2017; Bandow *et al.*, 2017; Kedzierski *et al.*, 2018; G. Liu *et al.*, 2019; J. Liu *et al.*, 2019; Gardon *et al.*, 2020a). For example, J. Liu *et al.* (2019) showed that aging can significantly affect the physicochemical properties of MP, and therefore, may influence their fate, transport, and effects (J. Liu *et al.*, 2019). For those reasons, it is essential to aim towards relevant environmental experiments in order to get close as possible to realistic scenarios and assess real risks related to MP.

Consequently, a scientific understanding of the environmental impacts of MP on marine biota requires a good evaluation of MP concentrations and characteristics in order to conduct relevant environmental experiments in laboratory conditions. This is particularly true for the smallest MP sizes (Huvet *et al.*, 2016). Following MP characterization, and as possible, targeting related sources, there is the need to test realistic scenarios. Employing realistic MP is the first step. Relevant ecotoxicological experiments presuppose chronic exposures involving large amount

and specific range sizes of MP that can't be provided solely by sampling campaigns. The laboratory production of MP (*e.g.* from macroplastics collected in the field, new plastic products or directly from polymers for reference MP production) (Balakrishnan *et al.*, 2019), is therefore a solution but remains a real challenge. Produced MP must be characterized for experiments to ensure the exact concentration exposed with appropriate size range fitting with the feeding of targeted biological models, which are more often filter-feeding species involving small-size particles.

In the lagoons of French Polynesia, pearl-farming has been associated with a specific source of plastic pollution linked to the accumulation from year to year of operational and abandoned equipment made of plastic (*e.g.* ropes, collectors, buoys, etc.) (Andréfouët *et al.*, 2014), thus representing potential hotspots of MP release. A recent monitoring study in pearl-farming lagoons revealed a widespread contamination by MP in both seawater and cultured pearl oyster (Gardon *et al.*, submitted). Among the possible ecological disturbances discussed in Andréfouët *et al.* (2014), one comes from a recent preliminary experiment conducted by Gardon *et al.* (2018) highlighted a dose-effect of polystyrene microbeads on the energy balance (Gardon *et al.*, 2018) and dose-specific transcriptomic disruption of gene expression (Gardon *et al.*, 2020b) in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera*). *P. margaritifera* is a biological model for lagoon ecosystem and environmental survey. It is also a species of commercial interest as pearl-farming takes a significant part in the territory development by being practise in 23 islands and atolls, and acting for the second economic resource. The importance to produce MP from *in situ* macroplastics potentially at the origin of MP contamination in pearl-farming lagoons makes sense in order to better simulate pearl oyster environment. The present analytical method proposes, to our knowledge, the first methodological protocol for MP production, here in the lower range (< 60 µm particles) of *P. margaritifera* particle sizes retention (2 to 200 µm) (Pouvreau *et al.*, 1999). This innovative approach is implemented in a case study specific to our work and asking for improvement to promote enabling new scientific and technical experiments in order to conduct ecotoxicological studies as realistic as possible.

Materials and methods

Plastic selection

Several plastic gears from pearl-farming activity were collected in a pearl-farm located in Manihi atoll (14°24′10.4″S, 145°57′29.2″W). In order to produce "realistic" MP, we focused our study on the two most abundant plastic gear (Andréfouët *et al.*, 2014) and the two most abundant polymer types among MP collected in pearl-farming lagoons (*i.e.* polyethylene [PE] and polypropylene [PP]; Gardon *et al.*, submitted). Thus, we collected synthetic ropes and spat

collectors, both suspected as potential sources of PE and PP microplastics (Gardon *et al.*, submitted). In our case, we identified PP and PE coming from spat collector (shade-mesh collector, **Figure 1**A-B) and synthetic rope (**Figure 1**D-E), respectively. Polymer identification was performed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

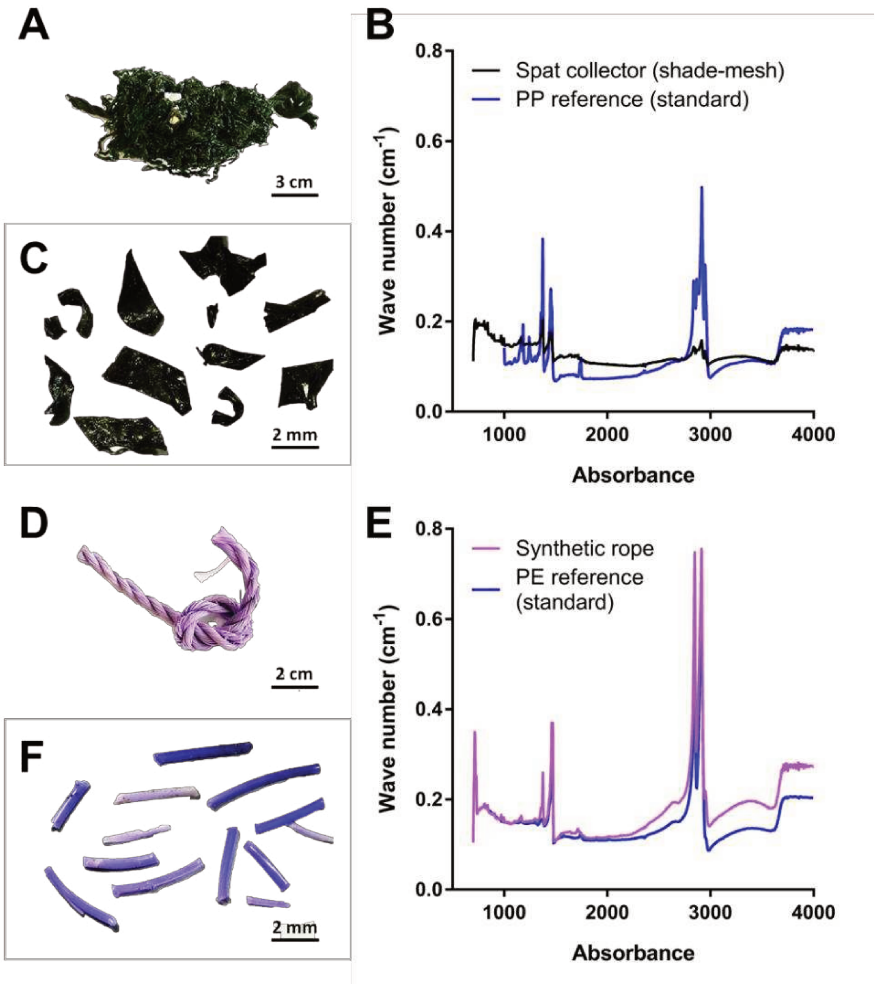


Figure 1. Polymer identification of pearl-farming plastic gear by FTIR. Polypropylene (PP) confirmation from spat collector (**A**-**B**) and polyethylene (PE) confirmation from synthetic rope (**D**-**E**). Pictures illustrate spat collector (A) and synthetic rope (**D**) and their associated plastic pieces (**C** and **F**) used for MP production.

Microplastics production

Plastic gears were first washed in saline water (100 g of $NaCl.L^{-1}$) overnight (o/n), then rinsed thoroughly and dried in a proofer at 60°C for 3 days. Spat collector and synthetic rope were then cut with clean stainless-steel scissors in ≤ 1 cm pieces (**Figure 1**C, F). A second washing in saline water was performed o/n on plastic pieces, followed by a rinsing with distilled water and

drying at 60°C for 3 days. Two grams aliquots of dried plastic pieces were packaged in aluminium batch and immersed in liquid nitrogen for mechanical cryogenic grinding. Steel grinding jars (50 ml) with 2 cm diameter steel ball were also cooled in liquid nitrogen and filled with an aliquot (2 g of plastic pieces per jar) once all materials were cooled down. Grinding jars were then placed in the Mixer Mill MM 400 (Retsch^{TM}) for grinding. Three running times were tested for each MP type: 1-, 2- and 3-minutes run of grinding. After grinding time, MP from spat collector (MP-1) and synthetic rope (MP-2) were dried at 60°C o/n before sieving.

A multi-step sieving phase was carried out in order to keep the MP 20-60 µm fraction. A first liquid sieving was performed through the 60 µm sieve with 70% ethanol to dissociate as much as possible MP aggregates and improve sieving in order to facilitate particles passage over the 20 µm sieve, then dried at 60°C o/n. The dried MP > 60 µm fraction was then suspended in 500 ml distilled water (*i.e.* ~ 1 g L^{-1}) and the solution was sonicated at 30 set min^{-1} during 5 min by constant stirring to reduce potential aggregates and improve the following sieving. Thus, a second liquid sieving of this solution was directly performed after sonication through the 60 µm sieve and the two sieves were dried at 60°C o/n. The dried MP > 60 µm fraction was weighed with a digital precision weighing instrument (RADWAG® PS 600.R2; read accuracy = 0.001 g) by passing de fraction on a tared cup. The MP 20-60 µm fraction followed the same liquid sieving as previously enounced. The MP 20-60 µm fraction was then rinsed a last time with 70% ethanol and dried at 60°C o/n before recovery and weighed. The MP 20-60 µm fraction was then conserved in stock solution by re-suspension in ethanol at 1.5 mg ml^{-1} for the characterization. A synthetic diagram of the MP production methodology is available **Figure 2**.

All the sieving steps were realized under the extractor hood and above a glass dish. The glass dish containing waste liquids (*i.e.* ethanol and rinsing water of materials) was placed in the proofer at 60°C until complete evaporation. The glass dish was then wiped with soak ethanol absorbent paper towels in order to collect solid matter (MP and potential nanoparticles). Used paper towels were treated as chemical waste. The cleaning and rinsing phase of materials was achieved between MP types and each grinding condition.

Quantitative assessment

Microplastics fractions were weighed to estimate the relative abundance of the > 60 µm and 20-60 µm fractions as well as the loss of plastic matter following production methodology. This was estimated by the initial 4 g of plastic pieces (*i.e.* 2 g per jar) used for each plastic type and grinding condition. The weighed MP fractions were used to calculated the loss of plastic matter by subtracting the corresponding values to the initial weight (*i.e.* 4 g).

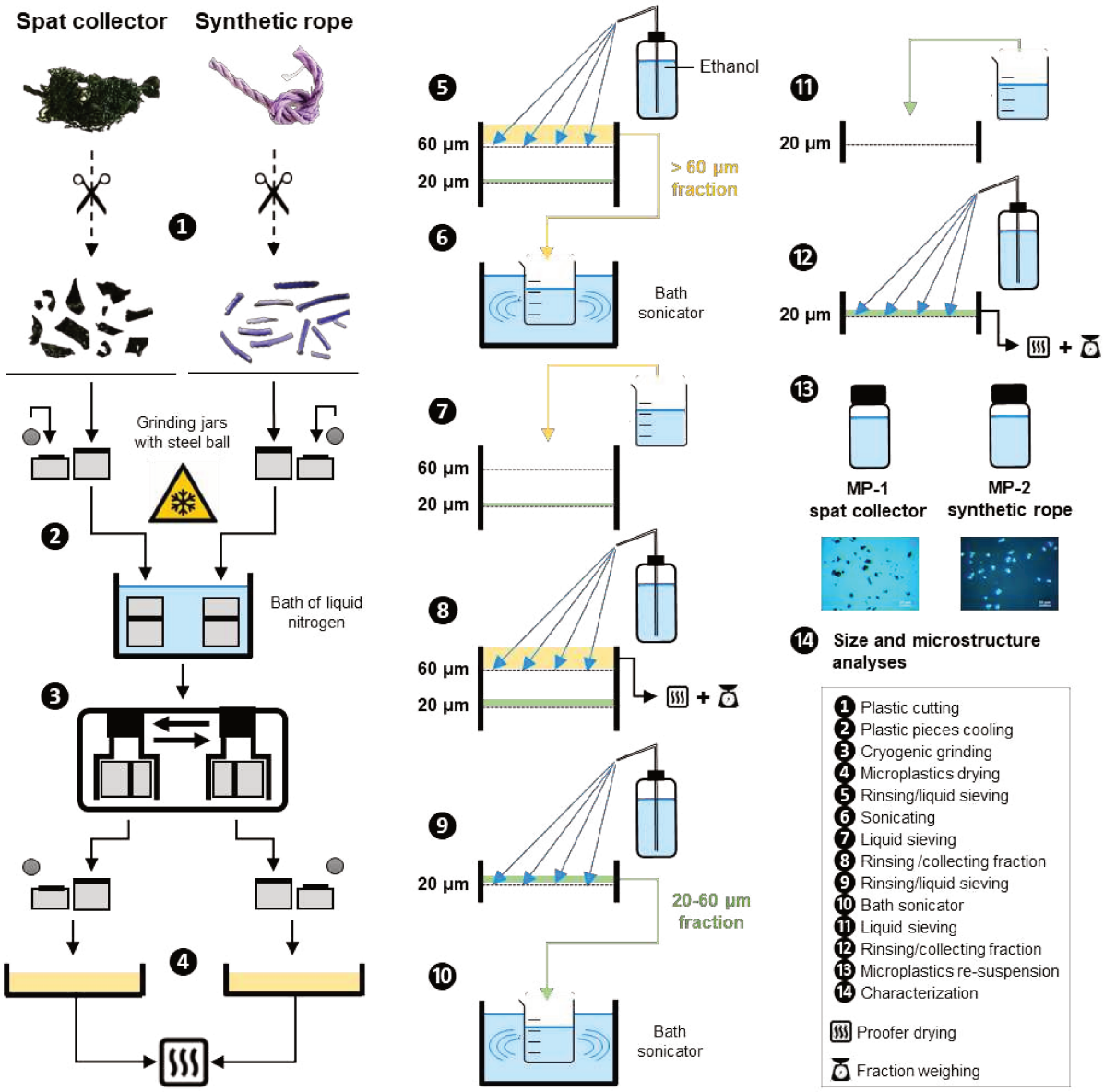


Figure 2. Synthetic diagram of the microplastics production methodology.

Particles characterization

Size distributions of MP produced were assessed using a Multisizer™ 3 Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) equipped with a 100 µm aperture tube (detection range of 2-100 µm). Suspending 1.5 µl MP solution was adding to 15 ml electrolytic solution (0.9% NaCl solution) previously filtered on a 0.2 µm sterile-filter. The suspension was shaken before measurement and three repeated measures with the 100 µm capillary (100 µl of analytical volume, 300 measured points from 2 to 100 µm size) were performed for each condition. Background measurements were also performed without MP suspension to quantify contamination in the electrolyte solution. Thus, MP concentrations and size distribution were

corrected. Laser diffraction and dynamic light scattering (DLS) analyses are underway by Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) and will provide finer characterization of particles until 0.4 µm and potential particles aggregation, respectively.

The particles microstructure was observed at 15 kV (in charge-up reduction mode) using a Hitachi TM 3030 scanning electron microscope (SEM) in order to characterize MP shapes and aggregates.

Data analyses

Data on MP size distributions were averaged and fitted using a non-linear regression (one phase decay function) on the 300 measured points (from 2 to 60 µm). A smooth curve was performed by targeting flattened measurements by high values in order to assess profiles of interesting fraction. The smooth curve was realised from 50 neighbours to average on each size with a 6th order smoothing polynomial. From a cumulative Gaussian-percentage function, we determined the maximum size of 50, 75, 90, 95 and 99% of all MP produced. Analyses were realised using GraphPad-Prism software (version 7.04, San Diego, CA).

Results and discussion

Quantitative assessment: an ambiguous approach

The quantitative approach following production methodology showed high proportions of MP in the > 60 µm fraction for both types of plastic regardless of grinding time (**Table 1**). The > 60 µm fraction from spat collector reached 99.0, 98.4 and 96.7% (weight) after 1-, 2- and 3-min run of grinding, respectively, and 91.0, 77.6 and 92.2% from synthetic rope, respectively (**Table 1**). Higher proportions of MP in the > 60 µm fraction from spat collector leaded to lower proportions of the interesting fraction (*i.e.* 20-60 µm) reaching only 0.9, 0.7 and 0.8% after 1-, 2- and 3-min run of grinding, respectively, while proportions from synthetic rope reached 3.7, 17.2 and 4.0%, respectively (**Table 1**). Therefore, MP production methodology leaded to higher levels in weight of losing matter from synthetic rope (*i.e.* 1.5 to 26 times more than spat collector) indicating a more important production of MP < 20 µm. We lost 5.2, 5.1 and 3.7% of matter from synthetic rope after 1-, 2- and 3-min run, respectively, and only 0.2, 0.8 and 2.5% of matter from spat collector, respectively (**Table 1**). Despite loss divergence according to plastic type (*i.e.* variability between ground plastic gears), we note that the loss of matter was relatively similar among grinding time. Overall, these results highlight a diverging grinding pattern from the two plastic types which seems to be linked (i) directly to the grinding efficiency according to plastic type (*e.g.* status of weathering process, diverging resistance due to different additives) and the shape of

plastic pieces and/or (ii) indirectly to the sieving efficiency. Indeed, even if liquid nitrogen makes the plastic more brittle, the grinding efficiency of plastic types is likely influenced by their resistance which is partly dependent on their weathering and additives (*e.g.* phthalates) initially present in their composition (Bolgar *et al.*, 2015). However, chemical analyses performed on these two plastic gears in a previous study revealed that levels of additives were similar in both aged spat collector ($\Sigma_{additives}$ = 102.8 µg g^{-1}) and synthetic rope ($\Sigma_{additives}$ = 108.0 µg g^{-1}) (Gardon *et al.*, 2020a). In addition, the grinding efficiency may be influenced by the shape of plastic pieces before grinding, quite flat and thin from spat collector in contrast to those from synthetic rope, cylindrical and thicker (**Figure 1**C, F), which would have favour fragmentation. Thus, we obtained 5 to 25 times more of MP 20-60 µm fraction (in weight) from synthetic rope than spat collector, with an optimal grinding time of 2-min run achieving 17.2%, the higher level among conditions (**Table 1**). Surprisingly, this fraction decreased after 3-min run reaching 4.0%, supposing the formation of MP aggregates (supported by counter coulter analyses showing 4,500 analysed particles after 2-min run of grinding *vs* 3,300 following 3-min run) which prevented their passage through the 60 µm sieve. This trend underlines the importance to take in consideration the relation between sieving efficiency and particles interactions according to plastic type and particles shape and size that could be involved in the divergence we observed intra- and inter-plastic type. This relation between particles, aggregates and their self-assembly could be driven by complex physical properties of MP which depend intimately on their size and microstructure (Damasceno *et al.*, 2012; Asai *et al.*, 2015).

Table 1. Microplastics fractions following production methodology according to grinding time.

Grinding time	Fraction	Plastic type	
		Spat collector (%)	Synthetic rope (%)
1 min	> 60 µm	98.97	91.03
	20-60 µm	0.86	3.73
	Loss	0.17	5.25
2 min	> 60 µm	98.44	77.63
	20-60 µm	0.74	17.25
	Loss	0.82	5.13
3 min	> 60 µm	96.69	92.23
	20-60 µm	0.76	4.05
	Loss	2.55	3.73

Particles self-assemblies induce biased sieving and size characterization

Particles size has a direct impact on their physical and dynamic properties into the polymer matrix. Overall, size distribution results obtained from MP 20-60 µm fractions demonstrated important divergence between associated particles sieving range and their real size regardless

of plastic type (**Figure 3**A-B). Indeed, despite precautions to dispose of MP < 20 µm, results showed 50% of MP < 2.4-2.8 µm from both plastic types indicating the potential occurrence of nanoplastics (NP) (**Table 2**). Despite the fact that small particles will count very little in weight and a lot in number, a plausible explanation of such sieving inefficiency is the formation of anisotropic assemblies as demonstrated on spherical NP uniformly grafted with macroparticles robustly self-assemble into a variety of anisotropic superstructures when they are dispersed in the corresponding polymer matrix (Akcora *et al.*, 2009; Damasceno *et al.*, 2012). Self-assemblies and particles interactions are probably less important by diluting polymer matrix during size characterization, allowing to observe these diverging results between quantitative and quality assessment. This physical phenomenon is illustrated with our results on size distribution showing a total of 6,800, 2,300 and 2,600 analyzed particles from spat collector after 1-, 2- and 3-min run, respectively (**Figure 3**A), and 7,200, 4,500 and 3,300 from synthetic rope, respectively (**Figure 3**B). In both plastic types, the number of analysed particles was higher after 1-min run, suggesting an increase of particles self-assembly according to their size decrease induced by a longer period of grinding. The DLS analysis will confirm this hypothesis. Furthermore, this self-assembly threshold was illustrated by a shifting between the non-linear regression from 1-min run data and those from 2- and 3-min run in spat collector (**Figure 3**A). This shifting pattern follows the theoretical self-assembly predictions showing particles uniformly grafted with polymer chains, each chain comprising *N* monomers (Akcora *et al.*, 2009). Here, particles self-assembly seems to increase between 1- and 2-min run, especially between particles and aggregates sizes of ~ 4 to 2.5 µm while no shifting was observed from synthetic rope regardless grinding time. Nonetheless, considering the non-linear regression of spat collector after 1-min run (**Figure 3**A) and those from synthetic rope after 1-, 2- and 3-min run of grinding (**Figure 3**B), similar curves were observed with a drastically increase of particles number in small sizes from ~ 4 µm, suggesting a shifting that may occur at a later time for synthetic rope (*i.e.* beyond 3-min run of grinding). Furthermore, similar size distribution among grinding times corroborates quantitative results from synthetic rope showing higher levels of the pseudo-expected sizes and loss of matter, supposing a less important self-assembly phenomenon than spat collector. This result underlines the importance to adapt the grinding period to plastic type but highlights the gap between what we expected from the sieving and what we really obtained, after checking with coulter-counter. However, we also demonstrated the necessity to consider size distribution as well as the total number of particles and aggregates since the aggregates are not dissociated during the measurement process with coulter-counter. It is also important to note that we did not characterize particles < 2 µm. Thus, a part of our size distribution remains unknown and highlights the need to further improve size characterization. A part of these uncertainties will be elucidated by the laser diffraction analysis for at least particles sizes up to 0.4 µm.

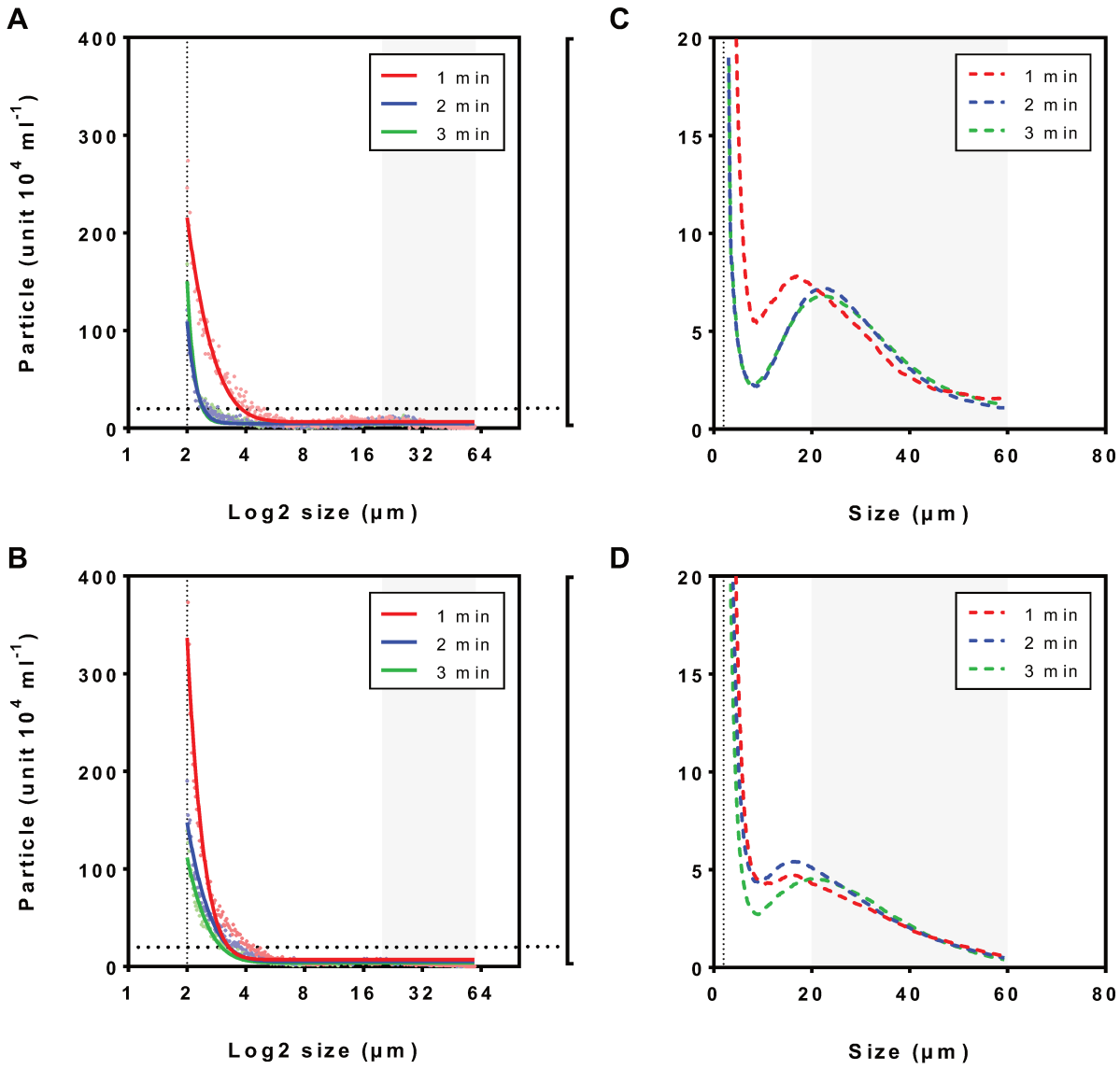


Figure 3. Microplastics size distribution in the 20-60 µm fraction. Non-linear regression of averaged measures on MP from (**A**) spat collector and (**B**) synthetic rope with associated smooth curves (**C** and **D**, respectively) on flattened measurements ranging from 0 to 20 ($\times 10^4$) particles ml^{-1}. Grey areas correspond to the sieving range from 20 to 60 µm.

In our study, the expected size range of 20-60 µm only reached 5.7, 17.8 and 16.1% of total MP produced from spat collector after 1-, 2- and 3-min run of grinding, respectively, and 3.6, 6.1 and 8.4% from synthetic rope, respectively (**Table 2**). These results are illustrated by smooth curves performed on flattened measurements of higher sizes showing a peak more pronounced in spat collector (**Figure 3**C) than synthetic rope (**Figure 3**D), at the opposite of quantitative results. Despite this slight difference, the profile remains the same among plastic types and provides further information of the current methodology (**Figure 3**C-D). Indeed, even if sieving

did not have the expected effect on the interesting MP fraction, we observed a peak for each condition included in the sieving range (20-60 µm) but shifted until ~ 8 µm before a drastically increase number of particles in small sizes. The shift may express the same physical phenomenon as previously discussed (*i.e.* self-assembly threshold in the polymer matrix between sieving and size characterization steps) but could reflect the effectiveness of the MP production methodology. Characteristics such as shape, surface properties, charge, polarizability or mass could determine self-assemblies producing structures and patterns at all physical scale (Whitesides and Grzybowski, 2002). This is confirmed by SEM analysis at the microstructure level showing superstructures of aggregates with various physical morphologies and sizes according to plastic type (**Figure 4**). Indeed, particles produced from spat collector seems relatively irregular (**Figure 4**A-B) in contrast to those from synthetic rope that seem to have singular morphotype with laminated structure (**Figure 4**C**-**D). In addition, particles interactions leading to particles aggregates may have been more important in spat collector (**Figure 4**B) than synthetic rope (**Figure 4**D) as illustrated by numerous particles with various sizes self-assembled. Molecular mechanisms involved in self-assembly are non-covalent or weak-covalent interactions such as van der Waals, electrostatic and hydrophobic interactions (Whitesides and Grzybowski, 2002). According to our results, it seems that these interactions are plastic type-dependent (Yanar and Kwetkus, 1995; Park *et al.*, 2008) as well as particles shape and size. Further research and development are needed to reduce these particles interactions in polymer matrices in order to dispose more of MP < 20 µm and get close as possible to the expected size range. The use of another solvent than ethanol to performed liquid sieving could be a promising investigation way.

Table 2. Relative abundance of microplastics produced in the 20-60 µm fraction according to their size distribution.

Percentage of all MP	Size distribution (µm)					
	Spat collector			Synthetic rope		
	1 min	2 min	3 min	1 min	2 min	3 min
50%	< 2.6	< 2.8	< 2.6	< 2.4	< 2.6	< 2.6
75%	< 3.8	< 14.4	< 11.5	< 3.3	< 4.0	< 4.2
90%	< 12.7	< 25.6	< 25.1	< 6.2	< 14.1	< 17.0
95%	< 21.1	< 31.1	< 31.4	< 15.2	< 21.6	< 25.9
99%	< 35.6	< 42.2	< 44.2	< 34.4	< 38.1	< 39.9
Proportion of MP in the 20-60 µm fraction (%)	**5.7**	**17.8**	**16.1**	**3.6**	**6.1**	**8.4**

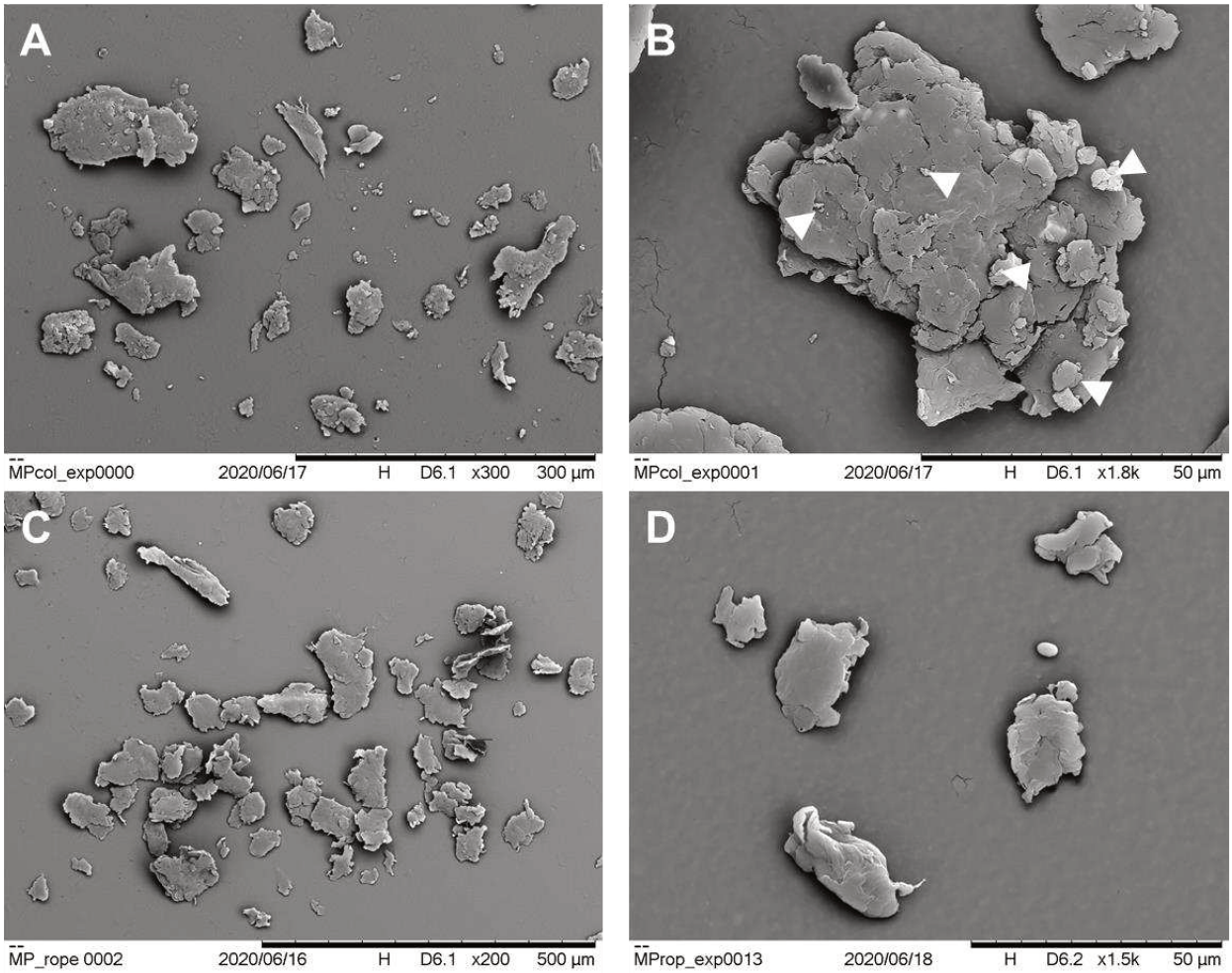


Figure 4. Representative SEM images of microplastics produced in the 20-60 µm fraction from spat collector (**A**-**B**) and synthetic rope (**C**-**D**). Pictures of MP were taken from polymer matrices in dry conditions. White arrows on picture B indicate a potential particles self-assembly on larger particle.

Implications

In this study, we tried to produced MP ranging from 20 to 60 µm in order to fit with the retention size range of *P. margaritifera* (*i.e.* 2-200 µm) (Pouvreau *et al.*, 1999). Particles characterization revealed that MP produced were ≤ 60 µm but results demonstrated an uncontrolled production of MP < 20 µm. Indeed, we demonstrated that mechanical grinding producing particles induced size decrease as a function of time but the energy provided during grinding can also have an opposite effect in the polymer matrix, initially a reduction in size then an increase beyond a certain grinding period. This physical phenomenon driven by particles aggregates is due to complex interactions between particles as a function of their size, shape and associated polymer matrix evolution during size reduction. Nonetheless, it is known in laboratory condition (but no published data) that it is very difficult to fine-tune the grinding and sieving to remove an undesirable fraction,

in particular the smaller ones such as NP (Paul-Pont *et al.*, 2018). This result is similar to some (eco)toxicological studies which have used grinding and sieving and showed a microscopic size range without proposing characterization in the nanometric range (*e.g.* Schür *et al.*, 2020). Nevertheless, some authors dealt with this question briefly, for example in mussels after an exposure of *Mytilus edulis* to "MP", Revel *et al.* (2019) discuss a possible implication of NP in the observed toxicity. Indeed, the presence of NP can be suggested in the study by Schür *et al.* (2020) who used "MP ≤ 63 µm" when the cut-off point (*i.e.* 2 µm) suggests the existence of particles below. This threshold is the lower limit of the measurement capacity of their device, the same used in the present study (*i.e.* coulter counter Multisizer^{TM} 3 equipped with a 100 µm aperture tube allowing a measurement window ranging from 2 to 100 µm). However, it is easy to suggest that particles are present (in significant numbers) below this low limit (*i.e.* < 2 µm). However, this low disconnection threshold is not considered in the exposition levels or in the potential multigenerational effects they observed in *Daphnia magna*, with the assumption that toxicity of particles increase with size reduction (Jeong *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2016). Therefore, since NP have specific properties and are considered to be more toxic than MP (Paul-Pont *et al.*, 2018), it is of great importance to have the full particle size distribution. Indeed, not considering their abundance represents a methodological bias because without characterization of particle sizes, exposition levels are not controlled, especially in terms of numerical concentrations, with many more nanometric particles in the expected concentrations. This is a real problem to assess the toxicity of micro- and nanoplastics to obtain relevant data for decision support; especially since no data is available regarding *in situ* NP contamination (Schwaferts *et al.*, 2019). Indeed, the reality is that very little is known about plastic particles under 10 µm as well as their fragmentation pattern and behaviour according to polymer type in the marine environment (Filella, 2015; Schwaferts *et al.*, 2019). However, it is well recognised that small MP were present in surface waters with increasing abundance as size decreased reaching a scale factor of 1.96 to 2.13 for the size range of 10-110 µm (Enders *et al.*, 2015; Erni-Cassola *et al.*, 2017). Further monitoring studies are needed to improve our knowledge on real exposition levels of marine organisms to micro- and nanoplastics in order to conduct experiments in realistic conditions. Globally, our results highlight that controlling the spatial distributions of small MP and NP in polymer matrices appears significantly challenging since their hierarchical self-assembly remain a physical problem (Akcora *et al.*, 2009; Asai *et al.*, 2015; Damasceno *et al.*, 2012; Krishnamoorti and Vaia, 2007; Lin *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Mastrangeli *et al.*, 2014). While waiting for a better knowledge of *in situ* contamination, there is an important need to better develop particles production methodology and their associated characterization that remain a technical and analytical lock.

Conclusions

This methodological experiment provides innovative and preliminary approach to produce MP for conducting more realistic ecotoxicological experiments. The cryogenic grinding methodology combined to several sieving steps enable to obtain a polymer matrix with various particles shapes and sizes. However, targeting a specific range of sizes by disposing of small particles is not standardized enough notably due to particles self-assembly. It is therefore necessary to follow the particle size of the sample as a function of the grinding time in order to target an optimal grinding period as close as possible to the expected size range. However, the real challenge of the current methodology is to perform a precise particles characterization since experiments must be conducted in controlled conditions asking for further work.

4. Article 6 (en rédaction) – *Science Advances*

Microplastics as a threat for pearl-farming in French Polynesia

Tony Gardon [a, *], Jérémy Le Luyer [a], Ika Paul-Pont [b], Alexandre Dehaut [c], Guillaume Duflos [c], Fabienne Lagarde [d], Virgile Quillien [a, b], Lauriane Bish [a], Claude Soyez [a], Gilles Le Moullac [a], Arnaud Huvet [b, *]

[a] Ifremer, ILM, IRD, Univ Polynésie française, EIO, F‐98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française, France

[b] Univ Brest, Ifremer, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France

[c] ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200, Boulogne-sur-Mer, France

[d] Institut des Molécules et des Matériaux du Mans, UMR CNRS 6283, Le Mans Université, Le Mans, France

* *Corresponding author*

Abstract

Plastic pollution in the marine environment is increasing at global scale. Over the past decade, microplastics (MP) have aroused a growing concern because of their detrimental interaction with marine biota. In French Polynesia, the widespread contamination by MP in pearl-farming lagoons was quantified and first evidence of negative effect of MP on marine organisms such as pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) have already been demonstrated in laboratory conditions (Gardon *et al.*, 2018, 2020b). However, these preliminary approaches were limited to model particles, as most of the literature to date on MP, and very few studies have investigated the impact of relevant MP scenarios. Here, we tested an experimental 5-month exposure of *P. margaritifera* to microplastics produced from plastic pearl-farming gear that oyster encounter in lagoons. MP exposure altered the energy metabolism and gene expression pattern in *P. margaritifera*. The pearl nacre deposition was significantly impacted at the microstructure level with a dose-dependent decrease for aragonite platelets thickness. Overall, our results demonstrated that MP may threaten pearl oyster biology with potential detrimental effect on the pearl quality. Ecological approaches are now required for testing holistic impact on populations maintenance and sustainability of the Polynesian's pearl industry.

Introduction

The increasing amount of plastic debris in the environment is a global concern. While plastic production and global consumption outpace proper waste management, plastic waste are accumulating in the environment, most of which ending up into the ocean (Jambeck *et al.*, 2015). Plastic debris can remain in the marine environment for hundreds to thousands of years with high resilience properties (Thompson, 2004). Owing to a combination of environmental factors (*e.g.* ultraviolet radiation, physical forces and hydrolysis) (Andrady, 2011), large plastic debris break down into smaller fragments, 92% of which are microparticles of plastic called "microplastics" (MP, defined as plastic particles < 5 mm) (van Sebille *et al.*, 2015). Given their ubiquitous nature and small sizes, MP have emerged as a global issue, leading to increased concerns about their ecological impacts. MP are likely to be ingested by a wide range of organisms (Galloway *et al.*, 2017), demonstrated under laboratory conditions on filter-feeding species (*e.g.* Wright *et al.*, 2013a; Cole *et al.*, 2015; Sussarellu *et al.*, 2016; Gardon *et al.*, 2018) and based on MP contamination of digestive tracts in wild animals (*e.g.* Leslie *et al.*, 2017; Bessa *et al.*, 2018). Experimental consumption of MP can result in adverse health impacts, including both physical (*e.g.* obstruction of the digestive tract) and chemical effects (*e.g.* endocrine disruption) affecting biological functions such as nutrition (Cole *et al.*, 2015a; Wright *et al.*, 2013a), respiration (Watts *et al.*, 2016), assimilation efficiency (Gardon *et al.*, 2018), reproduction (Sussarellu *et al.*, 2016; Cole *et al.*, 2015a; Besseling *et al.*, 2014) and growth (Besseling *et al.*, 2014; Watts *et al.*, 2015). However, most of laboratory experiments commonly used a single polymer type with spherical shape (microbeads) that we may called model particles, and particle concentrations higher in number of particles per volume than those found in the field (Lenz *et al.*, 2016; Phuong *et al.*, 2016). Yet the actual environmental exposure to MP are more complex involving various particle shapes, sizes, polymer types, surface characteristics and chemical composition; hence the complexity of studying the real ecological impact of MP in aquatic ecosystems (Lenz *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2018). Although a few studies have tried to consider the *in situ* MP exposure complexity (Revel *et al.*, 2019; Pannetier *et al.*, 2020; Schür *et al.*, 2020), the gap between potential risks and the actual risks associated to MP remain concrete within sight of lack of relevance in ecological terms in ecotoxicological experiments (Lenz *et al.*, 2016; Koelmans *et al.*, 2017).

In French Polynesia (FP), pearl-farming is the second economic resource with the trade of pearl and mother-of-pearl being widespread in 23 islands and atoll lagoons. However, pearl-farming is associated to a specific source of plastics since most of gear (*i.e.* ropes, collectors, buoys, etc.) are made of synthetic materials which accumulates over time and represents potential hotspots of MP release (Andréfouët *et al.*, 2014). A recent monitoring study in pearl-farming lagoons revealed a widespread contamination by MP in both seawater and cultured pearl

oyster (Gardon *et al.*, submitted). Water column was demonstrated to be a highly contaminated compartment (from 14.0 to 716.2 MP m^{-3}) where pearl oysters are cultivated and therefore subject to the greatest microscale MP pollution (Gardon *et al.*, submitted). Dominance of small-sized (20-200 µm) and fragment-shaped MP suggested the breakdown of larger plastic debris, with polyethylene (PE) and polypropylene (PP) as the most abundant polymer types (Gardon *et al.*, submitted). Ropes and spat collectors, the main plastic gears used in pearl-farming, both made of PE and PP (Gardon *et al.*, submitted) may therefore contribute significantly to these identified PE and PP particles. Hence, pearl-farming could be at the origin of its own risk relative to plastic pollution with potential impact of MP on the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, and more broadly on marine life and lagoon ecosystem.

Experimental exposure involving polystyrene microbeads have already demonstrated a dose-effect on the energy balance (Gardon *et al.*, 2018) and dose-specific transcriptomic disruption of gene expression (Gardon *et al.*, 2020b) in *P. margaritifera*. In the present study, taking advantage of newly environmental data on microplastic contamination in lagoons, we tested more realistic scenarios exposing pearl-farming micro- and potentially nanoplastics (MNP) to estimate the effects on pearl oyster and pearl quality by simulating a pearl production cycle. Thus, a 5-month *in vivo* exposure was performed on pearl oysters at three different MNP concentrations: 0 (control), 0.025 and 1 µg L^{-1}. An integrative approach was performed to assess the effects at individual, cellular and molecular levels such as energy metabolism (*i.e.* ingestion, respiration, assimilation) and gametogenesis. A special attention has been paid to the quality of the pearl not yet studied, with pearl formation, pearl production and pearl quality as well as biomineralization process. Gene expression in mantle, pearl sac and hemocytes was also performed by RNA-Seq transcriptomic approach. Providing data in a more realistic scenario should help decision making by government policies (Rochman, 2016b) in order to assess and anticipate this emerging risk for lagoon ecosystems and pearl-farming sustainability.

Materials and Methods

Experimental animals

Pearl oysters were sampled on April 03, 2018 in a pearl farm located in Mangareva island (23°06′34″S; 134°57′57″W), in the Gambier archipelago (23°07′S; 134°58′W, FP). A stock of approximately 600 adult oysters (1.5-2 years old; height, 7.6 ± 0.6 cm; mean ± standard deviation) were transferred (transfer authorization No. 643 issued by the Ministry of Marine Resources of French Polynesia) to the lagoon of Vairao (Ifremer marine concession No. 8120/MLD: 17°48′26.0″S, 149°18′14.4″W, Tahiti, FP) on April 04, 2018. Before being packaged

and transferred, all oysters were carefully inspected and cleaned. The experimental procedures comply with French law and with institutional guidelines.

Calcein marking

Before acclimation in experimental tanks, a total of 240 pearl oysters were selected for the experimentation (height, 7.6 ± 0.3 cm; weight, 36.1 ± 5.5 g) and placed in a 500 L-tank for calcein marking performed at 150 mg L^{-1} (calcein diluted in seawater) overnight in order to assess shell growth rate (Linard *et al.*, 2011).

Microplastics

Microplastics were produced from two widely used pearl-farming plastic gears (*i.e.* synthetic rope and spat collector) according to the methodological protocol of Gardon *et al.* (in redaction). Synthetic rope (SR) and spat collector (SC) used for this experiment were made of polyethylene (PE) and polypropylene (PP), respectively, of which corresponding FTIR spectra are the same than those obtained in Gardon *et al.* (2020a). These two polymers are the most commonly used plastic polymers worldwide, often found in MP sampled from pearl-farming atolls (Gardon *et al.*, submitted). We used micro- and potentially nanoplastics (MNP) with sizes ranging at least from 0.4 to 60 µm (characterization in progress by Institut des Molécules et Matériaux du Mans, IMMM) corresponding to the retention size range of *P. margaritifera* (*i.e.* 2-200 µm) (Pouvreau *et al.*, 1999).

Exposure

Pearl oysters were exposed over a 5-months period to 0 (control), 0.025 and 1 µg L^{-1} (~ 9.5 × 10^3 and ~ 3.8 × 10^5 particles L^{-1}, respectively) of MNP (awaiting of finer analyses by IMMM). These concentrations were chosen based on environmental estimations (Gardon *et al.*, submitted) and adapted according to a previous study on *P. margaritifera* showing a dose-effect on oyster physiology (Gardon *et al.*, 2018) and dose-specific modulation on genes expression (Gardon *et al.*, 2020b) following a 2-month exposure to polystyrene microbeads of 6 and 10 µm. Thus, considering the dominant size class of MP (*i.e.* 20-200 µm) sampled in the water column of Takaroa atoll (*i.e.* average concentration of 134.7 MP m^{-3}; Gardon *et al.*, submitted) and the volume of a spherical 20 µm-particle, the calculated mass concentration was estimated up to 0.677 µg of MP L^{-1}. On this basis, a concentration of 1 µg L^{-1} was established to test environmentally relevant mass concentration but probably not in number per volume since experimental MNP size distribution ranging from at least 0.4 to 60 µm. An intermediate dose of 0.025 µg L^{-1} was therefore tested to get closer as possible of "current" scenario (*i.e.* in number

of particles per volume) as well as targeting a response window to MNP stress while overlapping with the previous experimentation (decrease by a factor of 10 the lower dose of 0.25 µg L^{-1}; Gardon *et al.*, 2018, 2020b). This intermediate dose was also established to serve as a proxy for future experiments in the event of a too much extrapolation of *in situ* data related to our approach. Furthermore, a 2-month exposure was first performed on pearl oysters including graft donors and graft receivers followed by a graft step (1 day), then, the exposure was continued for receivers over a 3-month period before dissection.

Oysters (n = 240) were conditioned in duplicate in 6 rectangular 500 L-tanks (4 donors and 36 receivers for a total of 40 pearl oysters per tank, *i.e.* 80 oysters per condition). The seawater supply (natural seawater pumped from the lagoon) was mechanically filtered on 25 and 5 µm sock filters. In each tank, the homogeneity of the medium was maintained by a system of 2 air-lifts connected to the pressurized air circuit (at the bottom of the tank) and 4 circulation pumps placed at each angle of the tank and oriented to the water surface. A mixed diet of two microalgae (*Tisochrysis lutea* [*T-iso*], and *Chaetoceros gracilis*) was daily prepared in a cylindrical-conical 1000 L-tank supplying experimental tanks at a ratio dry-weight-algae/dry-weight-oyster of 7-8%. The mixed diet was pumped by a diaphragm pump settled for each tank and was injected continuously. The ration was determined to be below the threshold for triggering pseudo-feces production, so as to avoid overestimation of ingestion measurements (Lucas, 2008). This resulted in a mean concentration of 35 to 40 cells $µl^{-1}$ in the water surrounding the oysters.

After 2-weeks acclimation, both type of MNP (*i.e.* from SR and SC) was incorporated at equal weights according to the different tested doses (ratio SR/SC = ~ 1.34; awaiting of finer analyses by IMMM), and were injected continuously in the experimental design. The MP mixture was daily prepared in six cylindrical-conical 50 L-tank (1 per replicate). For each treatment, MP reservoir was previously filled with 40 L filtered (25 and 5 µm) seawater. To avoid aggregation, MNP solutions were added with Tween-20 at 10% of the MP stock solution volume before being supplied to the tanks. Tween-20 was also supplied to the control tank at the same concentration (*i.e.* 1 µl) as for the intermediate MNP concentration (*i.e.* 0.025 µg L^{-1}). The mixture was distributed by a peristaltic pump for 24 h, *i.e.* ~ 1.2 L of injected mixture per hour into the experimental tank. Oysters were maintained at 26.5 ± 0.6 °C under a 12 h light: 12 h dark cycle throughout the duration of the experimentation. The pH, dissolved oxygen and salinity of the seawater were 8.2, 6.8 ± 0.5 mg O2 L^{-1} and 35 psu, respectively. To prevent any dissemination of microparticles in waste water effluents, discharges were filtered successively on 5 and 1 µm sock filters. A synthetic diagram of the experimental design is given **Figure 1**.

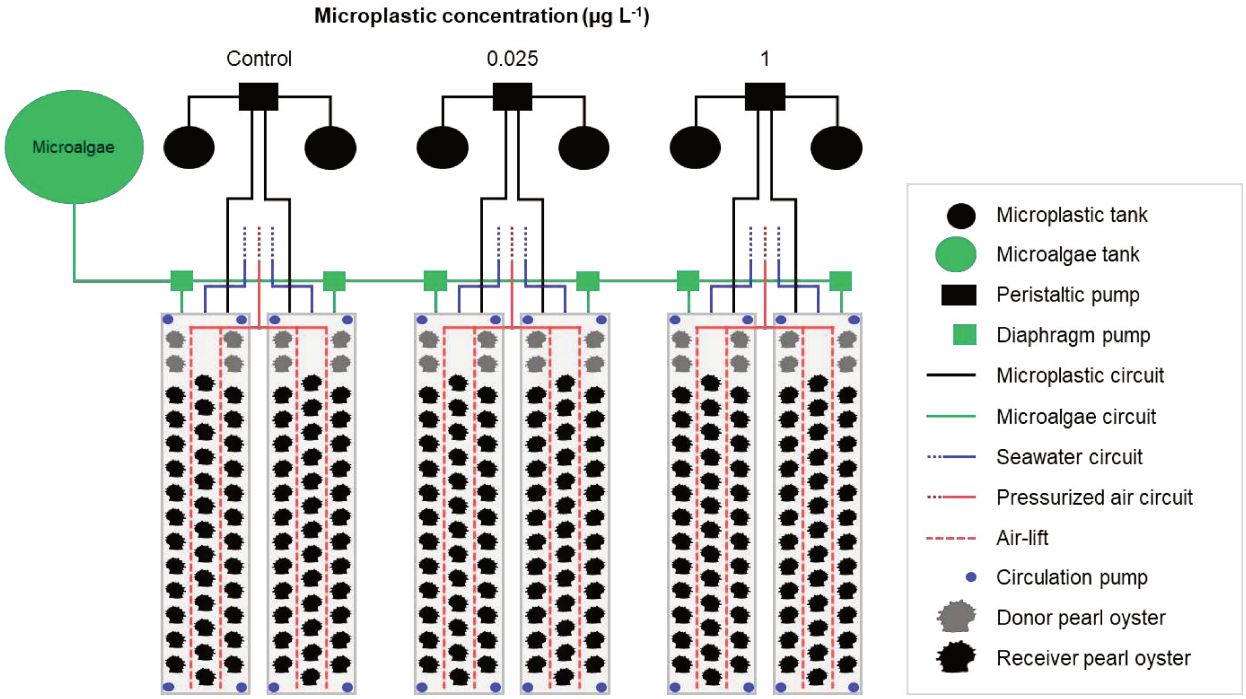


Figure 1. Experimental design. Microplastic tanks disposed in the control condition were only fulfilled with seawater and Tween-20.

Graft step

After 2-month exposure, pearl oysters got out of the water to process to the graft step. Receiver oysters were half-open with a prop and donor oysters were sacrificed. Ten grafts of mantle from each donor were sampled and transplanted to receivers (1 donor for 10 receivers). For each receiver, one graft and one nucleus (Ø 2.0 bu, ~ 0.6 mm) were both inserted in the pearl sac in order to simulate a pearl production cycle. This surgical operation was performed by a transplant specialist. Each nucleus was previously weighted with a highly accurate balance of 0.0001 mg readability in order to assess weight of mineral secretion (*i.e.* pearl nacre deposition) on its surface after harvesting (at the end of the exposure). One nucleus transplanted to one of the 10 receivers per donor was a magnetized nucleus (*i.e.* 4 per tank, 8 per treatment) for the assessment of pearl rotation in the pearl sac. Magnetized nucleus was produced by piercing the bead and including a bar magnet inside (length 0.5 mm; Ø 0.15 mm) before filling holes with dental resin. Once receivers grafted, all pearl oysters were putted back in their respective experimental tank to continue MP exposure over a 3-month period.

Ecophysiological measurement

After 2-weeks post-graft, ten receiver oysters per treatment were placed in an ecophysiological measurement system (EMS) to monitor clearance rate and oxygen consumption. The EMS consisted of eleven hemispheric open-flow chambers in transparent Altuglas®. One oyster was placed in each chamber and the eleventh chamber was occupied by an empty oyster shell to be used as control (Chávez-Villalba *et al.*, 2013). Experimental conditions of *in vivo* exposure were replicated in the EMS during measurements. For this, the chambers contained water at the same temperature and microalgae concentration as in the treatment tanks. Flow rates in the chambers were constant at 12 L h^{-1}. Each chamber was equipped with a two-way electromagnetic valve activated by an automaton. When the valve of one measuring chamber was opened, the released water was analyzed for 3 min using a fluorometer (10-AUTM, Turner Designs, Sunnyvale, CA) to measure microalgae fluorescence, and an oximeter (OXI 538/CellOX® 325, WTW, Weilheim, Germany) to measure dissolved oxygen. Data on clearance rate and oxygen consumption were stored on a computer with an acquisition software (computer programming by National Instruments™) and each cycle was completed within 3 min and another cycle started in the control chamber for 3 min (sequence: chamber 1, control, chamber 2, control, chamber 3, etc.). Oysters remained in the chambers for at least 48 h; measurements of each oyster were taken every 24 min until 120 measurements of clearance rate and oxygen consumption had been recorded (Chávez-Villalba *et al.*, 2013). A total of 120 pearl oysters were individually monitored in the EMS (40 oysters per treatment). Assimilation efficiency was measured after collecting biodeposits (*i.e.* feces) in each hemispheric chamber and 50 ml of microalgae mixture administered during ecophysiological measurements (Chávez-Villalba *et al.*, 2013).

Ingestion and respiration

Ingestion rate (IR) is an indicator of feeding activity (Chávez-Villalba *et al.*, 2013), and is defined as the quantity of microalgae cleared per unit of time. IR was estimated using fluorescence measurements and calculated as:

$$\mathrm{IR} = \mathrm{V} \times (\mathrm{C1} - \mathrm{C2})$$

where C1 is the fluorescence level of the control chamber, C2 is the fluorescence of the experimental chamber containing one oyster, and V is the constant water flow rate (12 L h^{-1}) (Chávez-Villalba *et al.*, 2013).

Oxygen Consumption rate (OC) was measured (mg O2 h^{-1}) by calculating the differences in OC between the control and experimental chambers:

$$\mathrm{OC} = \mathrm{V} \times (\mathrm{O1} - \mathrm{O2})$$

where O1 is the oxygen level in the control chamber, O2 is the oxygen level in the experimental chamber, and V is the water flow rate (Chávez-Villalba *et al.*, 2013).

Ingestion and oxygen consumption rates were estimated and an average calculated for each oyster, considering all values recorded after the measurements to stabilize. To compare IR and OC, it was necessary to correct for differences in specimen weight. Values of the ecophysiological activities were converted to a standard animal basis (1 g, dry weight), using the formula:

$$\mathrm{Y}s = (\frac{\mathrm{W}s}{\mathrm{W}e})^{b} \times \mathrm{Y}e$$

where Y*s* is the physiological activity of a standard oyster, W*s* is the dry weight of a standard oyster (1 g), W*e* is the dry weight of the specimen, Y*e* is the measured physiological activity, and *b* is the allometric coefficient of a given activity. The average *b* allometric coefficients were 0.66 for ingestion rate and 0.75 for oxygen consumption rate (Savina and Pouvreau, 2004).

Assimilation

Assimilation Efficiency (AE) of organic matter was assessed by analyzing microalgae and feces according to the method of Conover (1966) and described by Chávez-Villalba *et al.* (2013) (Chávez-Villalba *et al.*, 2013). Biodeposits of each individual were treated individually by filtration on a GF/C filter (1.2 µm of porosity, Ø 47 mm) previously burned at 450 °C and weighed. Filters were then dried at 60 °C for 24 h in order to obtain the dry weight of biodeposits (DW) and then burned at 450 °C for 4 h to obtain the weight of the mineral matter (W_{MM}). The weight of organic matter (W_{OM}) biodeposits was obtained by difference between DW and W_{MM}. The W_{OM} of the food ration was calculated in the same way from the mixture of microalgae. Microalgae organic matter was obtained by filtering 50 ml of the microalgae mixture and followed by treatment of biodeposits according to the same procedure as for organic waste. After conversion of the W_{OM} biodeposits and W_{OM} microalgae to relative values, the assimilation efficiency (AE, %) was calculated by the relation:

$$\mathrm{AE} = \frac{\mathrm{OM}m - \mathrm{OM}b}{(100 - \mathrm{OM}b) \times \mathrm{OM}m}$$

where AE is the assimilation efficiency, OM*m* (%) is the microalgae organic matter (0.87 for *Tisochrysis lutea* and 0.6 for *Chaetoceros gracilis*) and OM*b* (%) is the waste organic matter (biodeposits).

Energy budget

Ecophysiology data were converted into energy values to define the scope for growth (SFG) for each oyster:

$$\mathrm{SFG} = (\mathrm{IR} \times \mathrm{AE}) - \mathrm{OC}$$

where IR is the ingestion rate, AE is the assimilation efficiency, and OC is the oxygen consumption. We used 20.3 J for 1 mg of particulate organic matter and 14.1 J for 1 mg O_2 (Bayne *et al.*, 1987).

Pearl rotation

Pearl rotation was monitored in the pearl sac of pearl oysters with a magnetometer placed in derivation of studied treatment tank as described in Le Moullac *et al.* (2018). Briefly, the magnetometer is made of three main connected parts. The measuring part is a dome with sensors. The dome is a half-sphere of acrylic glass (Ø 20 cm) on which are set 25 magnetic sensors consisting of two components, the HMC1021 compass from Honeywell (a one-axis magnetic sensor) and an offset compensation circuit. Twenty-four of the 25 sensors are spread across the convex surface of the dome in three circles of eight elements at 0°, 30° and 60° angles with the base. The last sensor is located at the top of the dome at 90° angle. Each sensor is glued on the dome with a cyanoacrylate paste and protected by an acrylic glass tube. The electrical part of the magnetometer is composed of a data acquisition board with 26 RJ45 sockets (25 are used to connect the cables from the sensors and the last to make the ethernet connection with the computer) and 25 wiring cables, each of which ends in a RJ45 plug. The human–machine interface (HMI) is a program called "magneto", developed by VEGA Industrie (Avrainville, France). It is composed of a microcontroller using internal software to collect, process and transfer data to the software (magneto-magnetometer interface 1.0) that producing visualized data from real-time sensor. This interface is used to define communication, data acquisition parameters and make backup. For our experiment, the following parameters were defined: acquisition frequency: 50 (1/10 s); filtration rate: 5; and recording periodicity: 1 min. The export data file is a .CSV file, which the software names and data and time references: Magneto_AAAA_MM_JJ_HH_MM.csv. Data were processed with a MATLAB routine, converted into 3D coordinates for performing calculations on the pearl movement kinetics. Mean angular speed of rotation (min^{-1}) was recorded for 48 h before oyster change from another treatment.

Oyster sampling

At the end of the 5-month exposure period, all pearl oysters were dissected in order to collect, if present, pearls in pearl sacs. When no pearl was present, that implied a nucleus reject following graft step. Keshi production sometimes happen after reject and correspond to the biomineralization of the remaining grafted piece of mantle and/or particles which may penetrate in the pearl sac before healing of the transplantation incision. The visceral mass was then sampled, drained on absorbent paper and put in 10% formalin seawater for 72 h before being transferred into 70% ethanol for histology analysis. A piece of mantle and a piece of pearl sac were also sampled from each pearl oyster as well as hemocytes collected in the byssal gland with a needle (1 ml; 0.45 × 13 mm). These three samples were placed in RNA later solution (500 µl) and stored at –80°C before RNA extraction and sequencing for transcriptomic analysis. Each muscle from each pearl oyster was also sampled and directly frozen in liquid nitrogen before storage at –80 °C for energy reserve assessment by glycogen dosage.

Shell growth

The shells of dissected oysters were sawn with a "Swap Top" Trim Saw machine (Inland, Middlesex, UK), which included a diamond Trim Saw Blade (Thin Cut) IC-40961. Shell edges were then polished for 5 s with various grades of water sandpaper sheets. The shell sections were examined under a Leitz Dialux 22 compound fluorescence microscope equipped with an I3-filter block and an optical micrometer. Shell growth was measured by evaluating the thickness of deposits at the ventral side of the shell, from the surface to the calcein mark, with an optical micrometer (Linard *et al.*, 2011). Shell deposit rate (SDR) was calculated by dividing the thickness of deposits by the time which had elapsed since the marking. SDR is expressed in µm d^{-1} (Linard *et al.*, 2011).

Internal shell abnormalities

The valves of the oyster shell were pictured and visually observed in order to assess frequency distribution of internal shell abnormalities. Three levels of characterization were stated: normal shell, spot defect which looks like "small holes" on the internal shell surface and severe defect mostly associated to the marine parasite worm *Polydora spp.* (Liu *et al.*, 2017).

Gametogenesis

For histological analysis, the fixed gonads were dehydrated through a graded series of ethanol, embedded in paraffin, sectioned into 3 µm slices on a rotary microtome, stained using

hematoxylin and eosin and finally mounted on glass microscope slides. Gametogenesis condition was evaluated through the identification of regression signs (*i.e.*, epithelial detachment, advanced regression stage). The presence or absence of regression signs was assessed for each individual.

RNA extraction and sequencing

Total RNA was extracted from mantle, pearl sac and hemocytes samples with TRIZOL Reagent (Life Technologies, USA), at a ratio of 1 ml per 100 mg tissues, following manufacturer's recommendations. We validated RNA quantity, integrity, and purity with a Nanodrop (NanoDrop Technologies Inc., USA) and a 2100 BioAnalyzer System (Agilent Technologies, USA). RNA was dried in RNA-stable solution (ThermoFisher Scientific, USA), following manufacturer's recommendations, and shipped at ambient temperature to McGill sequencing platform services (Montreal, Canada). TruSeq RNA libraries were randomly multiplexed (n = 20-19 individuals per lane) and 100-bp paired-end (PE) sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 system at the McGill Genome Quebec platform (Montreal, CA).

Transcriptomic data analysis

We first filtered raw reads with Trimmomatic v0.38 for a minimum length (60 bp)) (Bolger *et al.*, 2014), minimum quality (leading: 20; trailing: 20), and for the presence of putative contaminant and remaining adaptors (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/). Read quality was assessed before and after trimming with FastQC v0.11.8 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) and MultiQC v1.6 (Ewels *et al.*, 2016). Only high-quality PE reads were retained and mapped against the reference genome (Le Luyer *et al.*, 2019) using GSNAP v2018.07.04 with (T. D. Wu *et al.*, 2016) default parameters, but allowing a minimum mismatch value of 2 and a minimum read coverage of 90%. We used only properly paired and uniquely mapped reads for the downstream analysis (T. D. Wu *et al.*, 2016). The count of differentially expressed genes (DEGs) was conducted with HTSEQ v0.11.2 (Anders *et al.*, 2015). The *DESeq2* v1.22.2 R package (Love *et al.*, 2014) was used to examine differential expression between MNP conditions and the control using a series of pairwise contrasts and Wald's tests. Genes were considered differentially expressed when absolute value of Log2Fold Change ($|Log2FC|$) > 2 and False Discovery Rate (FDR) < 0.01. Visualization of DEGs was conducted using a Venn diagram (Kolde and Kolde, 2015). For functional annotation, we tested for gene ontology (GO) enrichment using GOA-tools v0.7.11 (Klopfenstein *et al.*, 2018), implemented in the "*go_enrichment*" Github repository (https://github.com/enormandeau/go_enrichment) and the go-basic.obo database with Fisher's exact tests. Our background gene list included the whole gene set used for differential expression

after filtering for low coverage (n = 41,138 transcripts). Only GO terms with $P < 0.05$ and including a minimum of three differentially expressed genes were considered. Significant GO enriched terms were used for semantic-based clustering in REVIGO (http://revigo.irb.hr/). We used a principal component analysis (PCA) on DEG data to visually explore the individuals clustering per condition using the *ggplot2* R package. Data are presented as mean ± standard deviation and all analyses were performed and graphics drawn in RStudio v3.5 statistics software.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Normality of data distribution and homogeneity of variance were tested with the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. Means of IR, OC, AE, SDR, angular speed of pearl rotation and mineral secretion on nucleus were compared using one-way ANOVA for each treatment ($\alpha = 0.05$). Data expressed in proportion (*i.e.* AE) were previously transformed by the arcsine square root function. Tukey's post hoc test was used to determine the significant differences between the averages of each group. Since the assumptions of normality and homogeneity of variance were not met for SFG, aragonite fronts space and platelets thickness data, we used the non-parametric Kruskall-Wallis test to compare means of each treatment. Dunn's post-hoc test was used to determine the significant differences between the averages of each group. Frequency distribution of internal shell abnormalities as well as pearl and keshi production was analyzed using Pearson's Chi-squared test. Results were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Metabolic rates

Mean ingestion rate was higher at 1 µg MNP L^{-1} (12.37 ± 1.78 × 10^7 cells h^{-1} g^{-1}) compared to control (10.71 ± 1.36 × 10^7 cells h^{-1} g^{-1}) and 0.025 µg L^{-1} (10.48 ± 1.73 × 10^7 cells h^{-1} g^{-1}) conditions (Tukey's HSD; $P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) (**Figure 2**A-B). No significant difference was observed concerning the oxygen consumption (ANOVA, $P = 0.397$) reaching a mean of 0.78 ± 0.23 mg O_2 h^{-1} g^{-1} under control condition, 0.81 ± 0.23 mg O_2 h^{-1} g^{-1} at 0.025 µg L^{-1} and 0.85 ± 0.18 mg O_2 h^{-1} g^{-1} at 1 µg L^{-1} (**Figure 2**C-D). A significant decrease in assimilation efficiency was observed at 1 µg L^{-1} (26.76 ± 16.38%) compared to control condition (38.62 ± 10.46%; Tukey's HSD; $P = 0.001$) while only a slight reduction (but not significative) was observed from individuals placed under 0.025 µg L^{-1} condition (32.11 ± 10.78%) (**Figure 2**E-F).

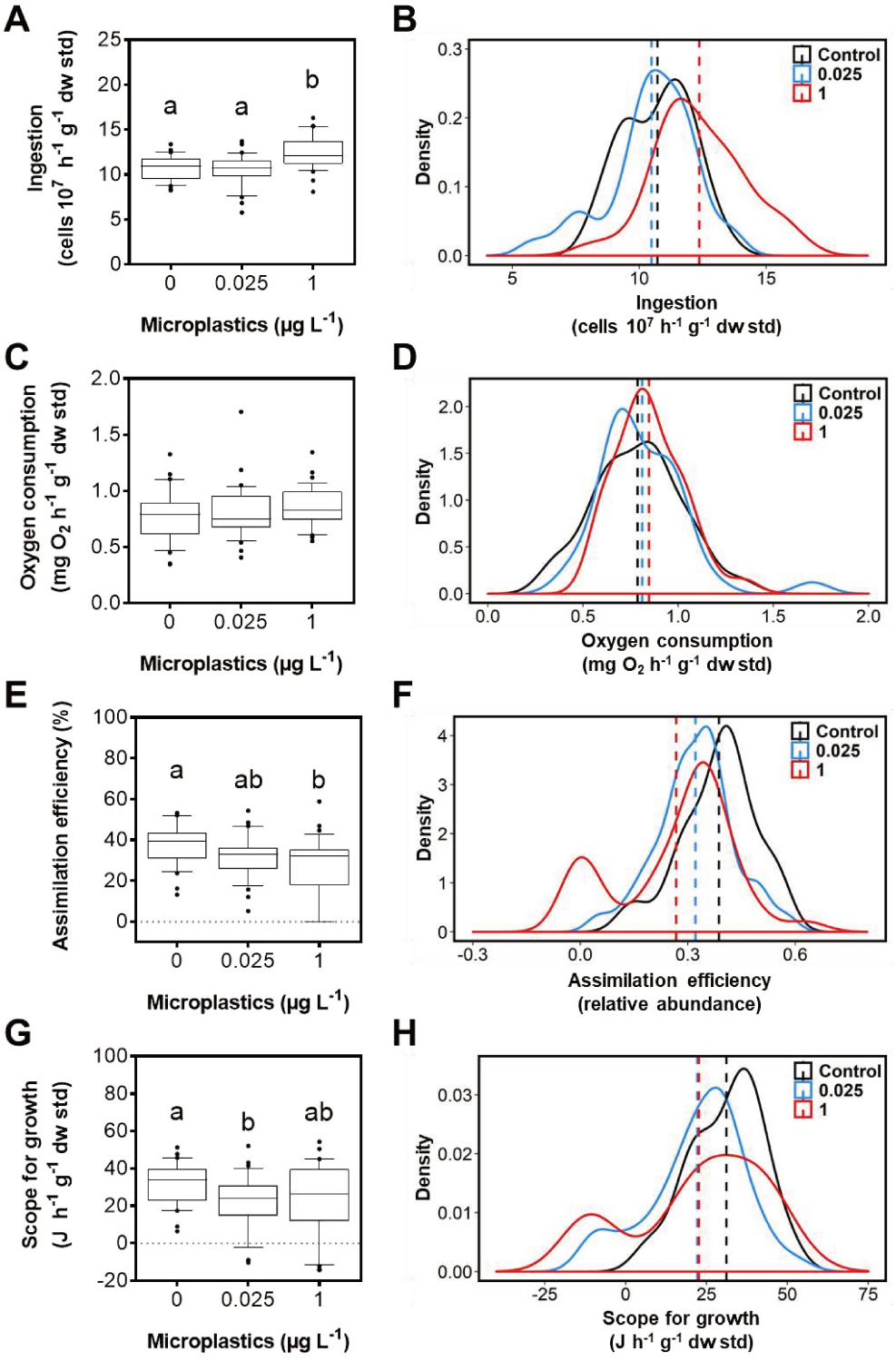


Figure 2. Energy metabolism of *P. margaritifera* exposed to microplastics. Results illustrate box plots of individual measurements (n = 40 per condition) and density plots considering individuals distribution according to ingestion rate (**A**, **B**), oxygen consumption (**D**, **E**), assimilation efficiency (**F**, **G**) and scope for growth (**G**, **H**). Dashed line on density plot indicates the mean of each condition. Differences between groups are illustrated by letters on histograms.

Scope for growth

Metabolic rates analysis indicated a mean energy balance (SFG) decreasing from the control condition (31.16 ± 11.04 J h^{-1} g^{-1}) to the MNP conditions (22.15 ± 14.71 J h^{-1} g^{-1} at 0.025 µg L^{-1}, and 22.64 ± 20.60 J h^{-1} g^{-1} at 1 µg L^{-1}) with unequal variances (Figure 2G-H). The Kruskal-Wallis test revealed no significant difference between conditions (P = 0.050) but the Dunn's multiple comparisons of means revealed a slight significant difference between the means of the control condition and the 0.025 µg L^{-1} condition (P = 0.048) (**Figure 2**G-H).

Energy reserve

The processing of muscle samples for glycogen dosage is underway.

Shell growth

No significant difference of shell growth was observed among conditions (ANOVA, P = 0.319) (**Figure 3**A). Indeed, shell deposition measured under calcein mark (**Figure 3**B-C) appeared very closed between conditions, 5.1 ± 1.6 µm day^{-1} in control condition, 5.1 ± 2.0 µm day^{-1} in 0.025 µg L^{-1} and 5.6 ± 1.9 µm day^{-1} in 1 µg L^{-1} (**Figure 3**A).

Shell defects

Frequency distribution of internal shell defects was significantly different among conditions (χ^2 = 6.0728, P = 0.048) with a mean of 26.0 ± 13.2% of individuals in control, 31.9 ± 11.4% in 0.025 µg L^{-1} and 48.1 ± 5.2% in 1 µg L^{-1} (**Figure 3**D). Distribution of internal shell defects was as follow: spot defect (**Figure 3**E) reaching 13.0 ± 6.6% (control), 13.1 ± 1.6% (0.025 µg L^{-1}), 24.1 ± 2.6% (1 µg L^{-1}), and severe defects (**Figure 3**F) reaching 13.0 ± 6.6% (control), 18.8 ± 13.1% (0.025 µg L^{-1}), 24.1 ± 2.6% (1 µg L^{-1}). A slightly greater frequency distribution of internal abnormalities was observed between individuals from 1 µg L^{-1} condition and those from control condition (Fisher's exact test; P = 0.020) (**Figure 3**D).

Gametogenesis

No sign of abnormal gametogenesis was observed by gonad cross section histology analysis.

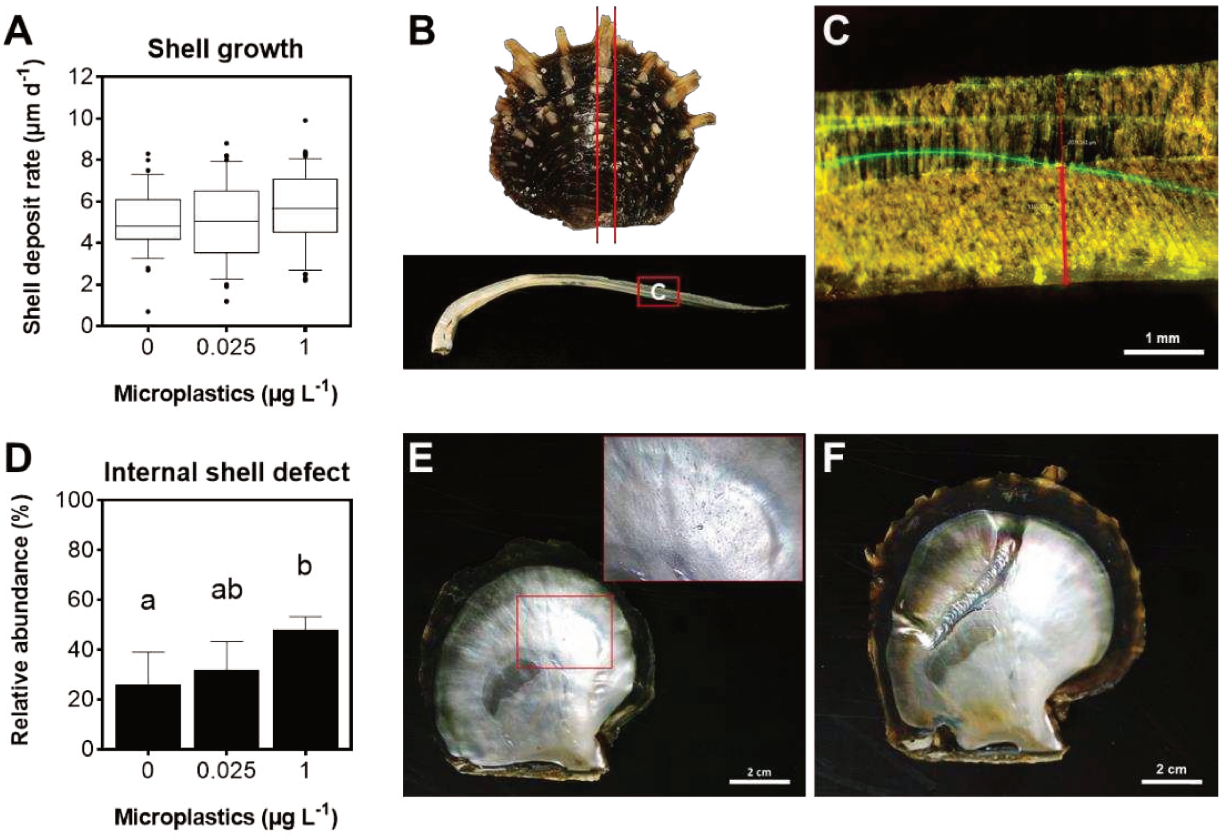


Figure 3. Shell growth and internal shell abnormalities. Box plots of shell growth (**A**) corresponding to the individual measurement performed on a cross section of shell (**B**) by considering the mineral deposition under the calcein mark (red segment; **C**). Relative abundance of internal shell defect among condition (**D**) considering spot defects (**E**) and severe defects (**F**).

Pearl rotation

The mean angular speed of pearl rotation was not significantly different among conditions (ANOVA, $P = 0.355$) reaching 5.9 ± 3.7 deg min^{-1} in control condition and 3.9 ± 1.5 deg min^{-1} and 6.5 ± 2.1 deg min^{-1} in 0.025 and 1 µg L^{-1}, respectively.

Harvest

The number of pearls collected at the end of the experimentation was not significantly different among condition ($\chi^2 = 0.16$, $P = 0.921$) with a mean of 62.4 ± 12.8% of control animals which have produced pearls, 55.1 ± 20.0% in 0.025 µg L^{-1} and 59.9 ± 11.4% in 1 µg L^{-1} (**Figure 4**A).

These results imply a rejection rate of grafted pearl oysters reaching a mean of 37.6 ± 12.8% in control, 36.2 ± 13.1% in 0.025 µg L^{-1} and 40.1 ± 11.4% in 1 µg L^{-1} condition. However, a

significant difference in keshi production (χ^2 = 7.22, *P* = 0.027) was observed, *i.e.* pearl oysters that have rejected their nucleus. A mean of 8.7 ± 6.9% and 17.6 ± 9.1% of pearl oysters that have produced keshi were detected in 0.025 and 1 µg L^{-1}, respectively, while no keshi was collected in the control condition (**Figure 4**B-C). A higher frequency distribution of keshi production was observed in 1 µg L^{-1} condition compared to control condition (Fisher's exact test; *P* = 0.039) (**Figure 4**B).

Pearl quality

A mean of 69.4 ± 46.4 mg of mineral secretion on nucleus (**Figure 4**E) was measured in the control condition, 85.8 ± 43.7 mg in 0.025 µg L^{-1} and 70.7 ± 51.3 mg in 1 µg L^{-1} (**Figure 4**D) revealing no significant difference between conditions in pearl nacre deposition (ANOVA, *P* = 0.38) (**Figure 4**D).

At the microstructure level, a slight significant difference of aragonite fronts space was observed at pearl surface (Kruskal-Wallis; *P* = 0.040) between control (16.1 ± 4.1 µm) and 0.025 µg L^{-1} (15.8 ± 3.7 µm) conditions (Dunn's test; *P* = 0.017). A mean of 16.2 ± 7.4 µm was measured in the 1 µg L^{-1} condition (**Figure 4**F-G). Means of aragonites platelets thickness were also significantly different (Kruskal-Wallis, *P* < 0.001) reaching 488.2 ± 122.0 nm in control, 446.6 ± 115.8 nm in 0.025 µg L^{-1} and 395.7 ± 95.7 nm in 1 µg L^{-1}. A highly significant decrease was observed between control and 0.025 and 1 µg L^{-1} conditions (Dunn's test; *P* < 0.001 and *P* < 0.001, respectively) and between 0.025 µg L^{-1} and 1 µg L^{-1} conditions (Dunn's test; *P* < 0.001) (**Figure 4**H-I).

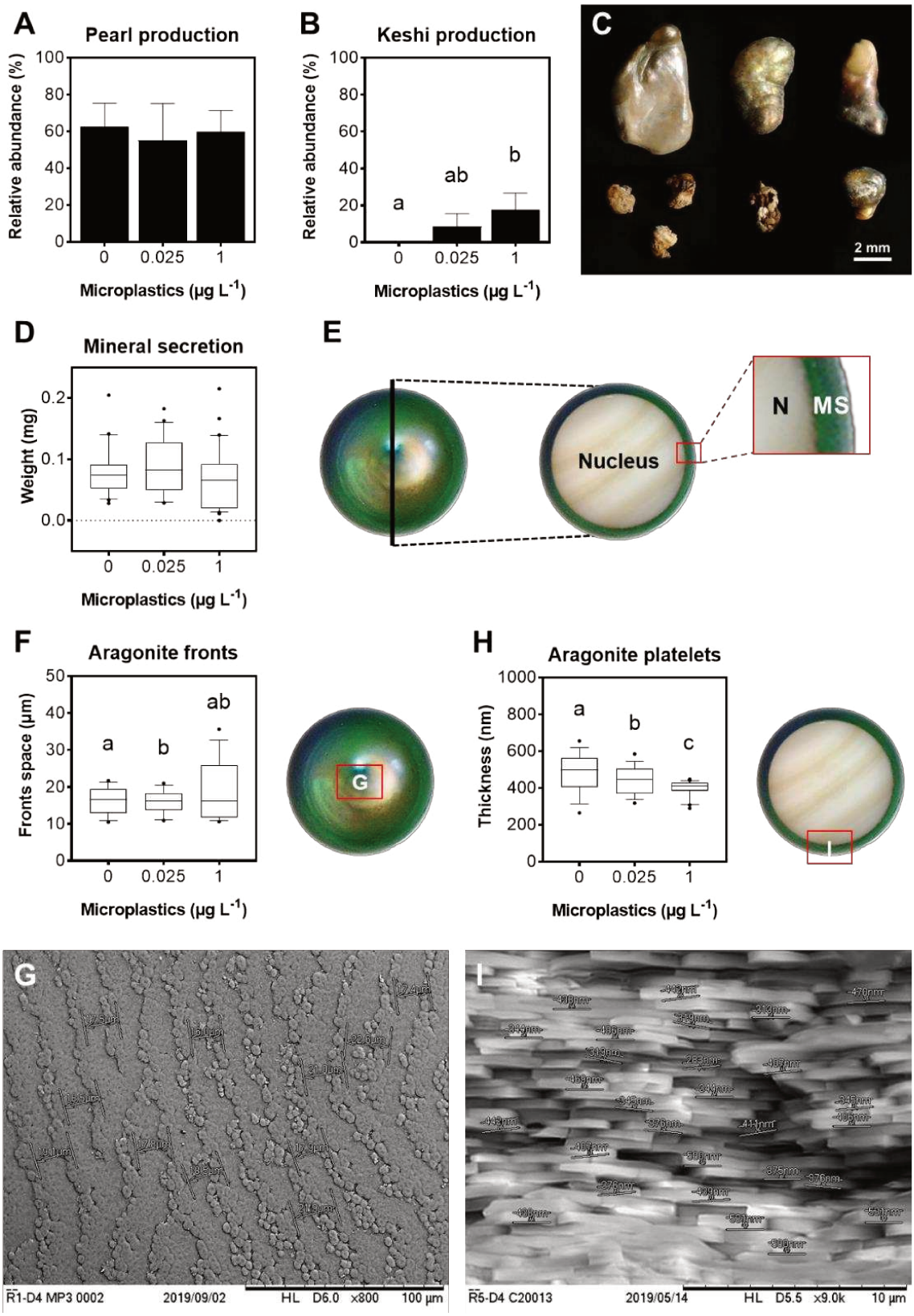


Figure 4. Pearl harvest and pearl quality following a 3-month production cycle under microplastic exposure. Pearl (**A**) and keshi (**B**) production and illustration of collected keshi morphotypes (**C**). Pearl quality assessment was based on mineral secretion (*i.e.* pearl nacre deposition composed of calcite and aragonite) produced on nucleus (**D**, **E**) and microstructures measurements of aragonite fronts space (pearl surface; **F**, **G**) and platelets thickness (**H**, **I**) performed with SEM on pearl cross sections. N: nucleus; MS: mineral secretion.

RNA Sequencing data and differential abundance of transcripts

Sequencing yielded a mean of 34.73 ± 9.55 M raw reads per individual. After trimming, 95.18% of the reads were recovered and used for downstream analyses. The PCA plot on mantle samples shows that axes 1 and 2 explain 37 and 14% of the total variance, respectively (**Figure 5**A). We found a total of 24 and 77 genes up- and down-regulated, respectively, from individuals under the 0.025 µg L^{-1} condition compared with control and 157 and 291 genes up- and down-regulated, respectively, in the 1 µg L^{-1} condition (**Figure 5**B). The PCA plot on pearl sac samples shows that axes 1 and 2 explain 33 and 23% of the total variance (**Figure 5**C). We found a total of 17 and 41 genes up- and down-regulated, respectively in the 0.025 µg L^{-1} treatment compared with control and 52 and 38 genes up- and down-regulated, respectively in the 1 µg L^{-1} treatment (**Figure 5**D). The PCA plot on hemocytes samples shows that axes 1 and 2 explain 87 and 2% of the total variance (**Figure 5**E). We found a total of 79 and 37% genes up- and down-regulated, respectively in the 0.025 µg L^{-1} treatment compared with control and 76 and 51 genes up- and down-regulated, respectively in the 1 µg L^{-1} treatment (**Figure 5**F). Gene ontology (GO) enrichment and gene identification of DEGs are underway.

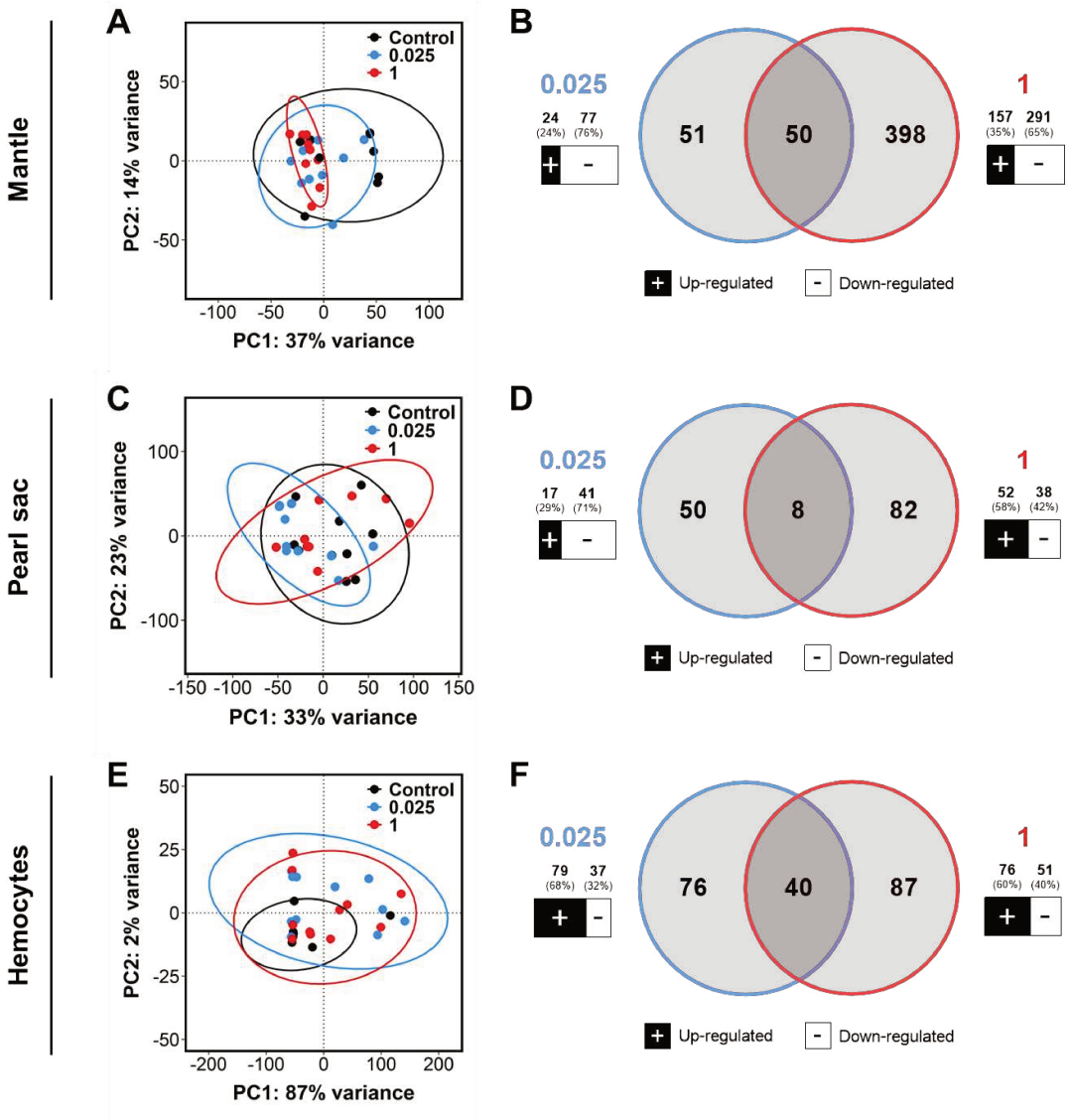


Figure 5. Individual gene expression in pearl oyster mantle, pearl sac and hemocytes and differentially expressed genes (DEGs) between MNP and control conditions. PCA plot of individuals with 95% confident interval ellipses for treatments (n = 10 individuals per treatment, excepted for control condition in hemocytes n = 7) and Venn diagram of DEGs in each condition compared to the control ($|Log2FC| > 2$; FDR < 0.01) and shared between up- and down-regulated genes. PCA plot of individuals and corresponding DEGs in mantle (**A**, **B**), pearl sac (**C**, **D**) and hemocytes (**E**, **F**). The total number of DEGs in 0.025 and 1 µg L^{-1} amount respectively to 101 and 448 in the mantle (**B**), 58 and 90 in the pearl sac (**D**) and 116 and 127 in hemocytes (**F**).

Discussion

Energetic metabolism

All biochemical and physiological processes involved in the life cycle of heterotrophic organisms are closely dependent on (i) their ability to extract the necessary energy from their

living environment *via* food intake and (ii) all the processes ensuring the management of this energy at different biological organization levels. Our findings show that MNP at *in situ* MP mass concentration alter experimentally pearl oyster energy metabolism with consequences at individual, cellular and molecular levels.

In the present study, we demonstrated a significantly lower SFG after a 5-months exposure to 0.025 µg L^{-1} (–9.01 J h^{-1} g^{-1}) while only a slight reduction was observed at 1 µg L^{-1} (–8.52 J h^{-1} g^{-1}). The scope for growth (SFG) defines the need of energy for growth beyond that is required for maintenance. SFG can thus be seen as a measure of an individual's potential to thrive in its environment. The SFG is mainly driven by ingestion and assimilation efficiency (Albentosa *et al.*, 2012), considered as the physiological parameters that most influence energy gain in bivalves (Hawkins *et al.*, 1999). Here, a dose-dependent decrease in assimilation efficiency was observed in exposed individuals with significant lower level at 1 µg L^{-1}. This result means that for an equal volume of water filtered by the oysters, the assimilation of microalgae was disrupted by the presence of MP, and the energy provided by food intake was lower for exposed oysters. This inhibitory effect of MP on food assimilation could occur either (i) directly, through interference with the assimilation processes within the digestive system, or (ii) indirectly, through competition with microalgae present in the conditioning medium. These results are further proof under a more realistic scenario of a decrease in assimilation efficiency already discussed in our previous 2 months exposure using polystyrene microbeads of 6 and 10 µm at 0.25, 2.5 and 25 µg L^{-1} (Gardon *et al.*, 2018). Here, we did not observe a dose-effect relationship on SFG decrease as in (Gardon *et al.*, 2018). This divergence is due to ingestion rate that appeared significantly higher in pearl oysters exposed to 1 compared to 0.025 µg L^{-1}, suggesting a compensatory effect. This compensatory effect by increasing food intake for limiting energetic lost due to digestive disruption was observed in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) following a reduction of energy intake after a 2-months exposure to micro-PS (2 and 6 µm; 23 µg L^{-1}) (Sussarellu *et al.*, 2016). Such mechanism was only observed in *P. margaritifera* at highest dose and not in the intermediate one despite the slightly decrease in assimilation efficiency. The digestive disruption must have been sufficiently low in the intermediate dose that this would not generate any compensation on ingestion that appeared similar in 0.025 and control animals. The explanation of this result is rather seeking in oxygen consumption that could have been reduced in order to counterbalance the decrease in energy intake. However, oxygen consumption appeared not impacted by MP leading to an imbalance between both energy inputs and costs affecting the energy balance of individuals through a significant decrease in SFG at 0.025 µg L^{-1}. In this case, energy cost is not offset by an equivalent increase in energy intake, the body is thus forced to sacrifice some of the energy normally allocated to functions such as growth and/or reproduction (Sokolova, 2013). Shell deposit rate, a proxy of growth, was not different among conditions after 5-months exposure, and was thus somehow maintained, despite this decrease in SFG. These

results indicate that exposed oysters had to draw their energy from reserves, or had to gain it by scarifying another biological compartment such as reproduction (Gardon *et al.*, 2018; Sussarellu *et al.*, 2016). It was not the case here as no alteration on gametogenesis was detected in exposed pearl oysters. Glycogen measurements in pearl oyster muscles are underway and will provide the answer if exposed individuals may had drawn their missing energy in energy reserves.

Subcellular effects

Micro- and nanoplastics are known to generate toxic effects at the subcellular level by interacting with metabolic processes and/or by generating damage to biomolecules (Prokić *et al.*, 2019). In this work, the establishment of compensatory responses to counter these deleterious effects seem to be confirmed at the transcriptional level. We noticed that the overall number of differentially expressed genes (DEGs) relative to the control was higher in the 1 µg L^{-1} treatment compared to 0.025 µg L^{-1} regardless the analyzed tissue (*i.e.* mantle, pearl sac, hemocytes). This result is consistent with the transcriptomic activity and breakdowns in stress-specific response observed between lower and higher micro-PS doses (0.25 µg L^{-1} *vs* 2.5 and 25 µg L^{-1}) previously tested in *P. margaritifera* (Gardon *et al.*, 2020b). Indeed, Gardon *et al.* (2020b) demonstrated that several biomarker genes and affected biological functions following MP exposure were likely related to an energy-limited tolerance to stress (Sokolova, 2013) in individuals and their physiological status; hence supporting the energy depletion observed on same individuals (Gardon *et al.*, 2018). In our case and based on this previous study, individuals exposed to 0.025 µg L^{-1} showed lower fitness in terms of SFG and lower DEGs number which may translate the incapacity of individuals to maintain proper molecular functioning when facing MNP stress. Identification of DEGs biological functions is underway and will provide further deeply elements for discussing on variations into molecular mechanisms. Transcriptomic approach may help understanding possible origins of internal shell abnormalities observed on exposed pearl oysters. Indeed, spot defects were likely induced by the presence MNP through the alteration of mantle epithelial cells (Al-Khalaifah and Al-Nasser, 2018). That kind of biomineralization anomalies of the shell in the form of "small holes" and/or surface roughness were also observed in D-larvae of *C. gigas* after an exposure to 50 nm nano-PS-NH2 (Tallec, 2019). Transcriptomic profiles obtained by Balbi *et al.* (2017) also suggest an alteration of calcium carbonate production in mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to nano-PS-NH2 of 50 nm. Furthermore, severe defects observed in the present study were mostly associated to the infestation of the marine worm *Polydora spp*. This polychaete can drill through the shell and reach to the visceral mass, leading to ulceration of the visceral mass as well as shrinkage of mantles, gills or adductor muscle, and thus causing death of the oysters (Liu *et al.*, 2017). Molluscs are known to have internal immune response against foreign particles and organisms which reflects the inherent

non-specific response that provides the first line of defense. Anatomic barriers (*e.g.* mantle), hemocytes (*e.g.* phagocytic cells), and physiological components are the main elements of the innate immune response in molluscs (Al-Khalaifah and Al-Nasser, 2018). Thus, mantle and hemocytes transcriptomes will provide genetic parameters of innate immune response to MNP. An immune deficiency have already been demonstrated in *P. margaritifera* exposed to micro-PS at 0.25 µg L^{-1} by the modulation of *myd88* (*myeloid differentiation primary response 88*) (Gardon *et al.*, 2020b). Therefore, an immune deficiency coupled to an energy depletion could have explained a lower resistance of exposed pearl oyster to face parasitism such as *Polydora spp* (Liu *et al.*, 2017). On the other side, once gene ontology and gene identification of DEG will be established (still ongoing), transcriptomic approach on mantle and pearl sac will help to determine if biomineralization-related genes (or other modulated responses) are impacted by MNP exposure and support pearl quality results obtained at the end of our 3-month simulated production cycle.

Alteration of pearl nacre deposition

Pearl quality assessment revealed strong effects of MP exposure on the microstructure of pearl nacre deposition. Indeed, a significant dose-dependent decrease in aragonite platelets thickness was observed as well as a significant reduction of aragonite fronts space in the 0.025 µg L^{-1} treatment. Thinner aragonite platelets of pearls have already been demonstrated to be influenced by lower temperature conditions (Muhammad *et al.*, 2017). Ironically, this thin structure is more preferable than the thicker aragonite platelets, at least in the latter phase of the culturing period, since aragonite platelets formed near the surface of the pearl just before harvest determine the pearl luster and interference color (Muhammad *et al.*, 2017). However, this effect occurred only after 3-month exposure to MP while pearl production cycle proceeds during 18 months. It is therefore conceivable that such dramatic effect may exacerbate on the long-term following prolonged MP exposure. Indeed, a stop production of pearl nacre deposition has already been demonstrated in *P. margaritifera* after temperature stress conditions (Le Moullac *et al.*, 2018). Considering the influence of energy metabolism in shell growth (Joubert *et al.*, 2014) and its positive correlation with the pearl nacre deposition rate (Le Pabic *et al.*, 2016), energy metabolism disruption observed in exposed pearl oysters may be fed-back on pearl nacre deposition rate at the microstructure level. In our study, the significant reduction in aragonite fronts space and platelets thickness observed in 0.025 µg L^{-1} treatment is in adequacy with the significant decrease in SFG observed in same individuals. This tendency is, however, less obvious considering individuals exposed to 1 µg L^{-1} which developed compensatory effect on food intake to maintain proper energy gain, and yet showed significant reduction in aragonite platelets thickness. Further work is required to better understand the mechanisms involved in

biomineralization processes and the role of energy metabolism in pearl nacre deposition at the microstructure level.

Harvest performed at the end of the experimentation also demonstrated that pearl oysters which had rejected their nucleus post-drafting produced significantly more keshi in the 1 µg L^{-1} treatment than control condition. This result indicate that MP are probably at the origin of this keshi production. This phenomenon may be explained (i) by an external intrusion of MNP present in the conditioning medium through the incision made on the pearl pouch by the operator before receiver oyster healing and/or (ii) by translocation of small MP and potential nanoplastics (NP) across epithelial membranes (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018). This hypothesis is currently under study thanks to ANSES LSA laboratory (G. Duflos, A. Dehaut, Boulogne-Sur-Mer) based on imaging and pyrolysis measurements to determine if signatures of the two cryo-milled plastic pearl-farming gears are included within the keshis recovered in this experiment. Indeed, considering MNP used in the present study, even if size distribution of MNP produced are included in the size range 0.4-60 µm (in number and volume of particles), we cannot exclude the presence of particles < 0.4 µm and their fate in the conditioning medium. Laser granulometry measurements are in progress at the IMMM laboratory (F. Lagarde, Le Mans University) to determine the existence of nanoplastics in our produced particle fraction from plastic pearl-farming gears. This unknown part highlights all the complexity to conduct relevant environmental experimentations on MP because we simply do not know how much NP is in the environment and how control their fate. Thus, toxicological effects induced by NP should be consider as well as chemicals identified in pearl-farming gears used for MNP production (Gardon *et al.*, 2020a).

Implications

The MNP concentrations tested in the present study were in term of MP mass concentration near to what we estimated from Gardon *et al.* (submitted) that may occur in the pearl oyster living environment. Thus, the environmentally relevant mass concentrations were lower (*i.e.* 0.025 µg L^{-1}) and in the range (*i.e.* 1 µg L^{-1}) of the *in situ* concentration (*i.e.* 0.677 µg of MP L^{-1}) extrapolated from the average MP numerical concentration measured in the water column of the pearl-farming atoll of Takaroa (French Polynesia; *i.e.* 134.7 MP m^{-3}; Gardon *et al.*, submitted). However, this extrapolation based on a single size (*i.e.* 20 µm) attributed to the entire numerical *in situ* MP contamination inevitably induce bias in our experimental approach which aimed to be ecologically relevant. In addition, due to methodological limitations, it should be noted that there is a lack of consistent field evaluations of the presence of MNP < 20 µm in pearl-farming lagoons (Gardon et al, submitted) and < 10 µm in the literature (Schwaferts *et al.*, 2019). These missing data limit (i) our knowledge of real exposition levels that pearl oysters are facing and (ii) our ability to be able to approach as close as possible to environmental scenarios in laboratory conditions.

Nevertheless, field studies demonstrated that the abundance of small plastic particles increases by a factor of 1.96 (Enders *et al.*, 2015) to 2.13 (Erni-Cassola *et al.*, 2017) as their size decreases for particles ranging from 10 to 110 µm. Thus, in the absence of *in situ* data for particle sizes < 10-20 µm, part of our ecotoxicological study can be considered as a toxicological approach allowing to acquire data relating to potential risks that MNP may represent for *P. margaritifera*. Given that "microplastics" is an ever-evolving thematic, this information is crucial with regard to our future knowledge. Moreover, assuming no waste management to get rid thousands of tons of plastic waste accumulated for years in pearl-farming lagoons, the cumulative quantity of MP is predicted to increase in the coming years due to constant ageing process (Lebreton *et al.*, 2019). Therefore, our study also contributes to an early warning system and provides necessary data to government policies in order to limit the impact of MP in decades to come.

To conclude, this study highlighted that closely mimic *in situ* conditions of MP alters energy budget mainly through assimilation efficiency. Compensatory effect on food intake was suggested at 1 µg L^{-1} to counterbalance the decrease in energy intake presumably due to digestive disruption while no such mechanism was observed at 0.025 µg L^{-1} explaining the deleterious effects on energy budget. It should therefore be noted here that stronger impacts can be observed at lower doses, which is of importance for decision-making. Energy metabolism disruption seems to feed-back on different biological organization levels by altering genes expression as well as strong effect on pearl quality in both MNP concentrations. It is relevant to note that such compensatory effect on food intake was observed in experimental conditions of abundant (*ad libitum*) food supply with constant oxygen and temperature. Such parameters are variable in environmental conditions in particular food availability considering oligotrophic conditions of lagoon ecosystem. Therefore, more dramatic effects on the energy metabolism of exposed pearl oysters (to 1 µg L^{-1}) are expected in natural conditions. Moreover, in a multiple stressor context associated to global change (*i.e.* temperature, acidification), combined effects of variable parameters in environmental conditions with MP exposure could have a more profound impact on marine organisms (Wen *et al.*, 2018). Nevertheless, a lot of work is still required in order to control and cover all the complexity of MNP exposure alone (*i.e.* diversity of particle shapes, sizes, polymer types, surface characteristics and chemical composition). Indeed, there is an urgent need to perform realistic experiments considering environmental scenarios but fundamental studies unraveling origins of MNP toxicity remain unavoidable as a large body of basic information is missing (*e.g. in situ* NP contamination) (Paul-Pont *et al.*, 2018; Schwaferts *et al.*, 2019). Finally, this study confirms the actual threat of MP that pearl oysters and related economy are facing as well as lagoon ecosystem in French Polynesia.

5. Conclusion et perspectives

Les approches expérimentales développées dans ce *Chapitre V* avaient pour but de tendre vers une pertinence écologique en simulant des scenarios de contamination microplastique proche d'une réalité environnementale lagonaire que ce soit pour les types de MP comme pour les doses d'exposition. Celles-ci reposaient en premier lieu sur une approche toxicologique qui a permis de démontrer le potentiel de toxicité chimique des lixiviats de structures perlicoles pour le développement embryo-larvaire de *P. margaritifera*. En effet, une diminution du nombre de larves formées et une augmentation des mortalités ont été constatées après 24 h d'incubation des œufs fécondés dans les lixiviats obtenus à partir de 100 g de plastique.L^{-1}. Les analyses chimiques effectuées sur les cordes et les ombrières de collectage ont permis d'identifier 26 composés chimiques (*i.e.* HAP et additifs). Aussi, des niveaux de phtalates 13 à 24 fois plus élevés ont été mesurés dans les lixiviats issus des structures neuves comparés à ceux issus des structures usagées, démontrant ainsi le grand potentiel de dissociation des additifs de la matrice polymère en milieu liquide. Cette différence expliquerait les mortalités embryo-larvaires observées après 48 h d'exposition aux faibles concentrations de lixiviats (*i.e.* 0,1-10 $g.L^{-1}$) issus des structures neuves. Ainsi, ce test de toxicité *in vitro* a révélé que les lixiviats issus des structures neuves sont plus toxiques que ceux issus des structures usagées. Par ailleurs, cette étude suggère que les cordes et les collecteurs de naissains utilisés en perliculture libèrent des quantités importantes de produits chimiques dangereux au cours de leur utilisation. Les zones d'accumulation massive de déchets plastiques perlicoles mais également les zones d'élevage pourraient représenter des « hotspots » de désorption de contaminants chimiques. Ce relargage de composés toxiques pourrait affecter les jeunes stades de développement de *P. margaritifera* qui sont en contact direct avec ces structures en plastique et plus largement la vie marine présente dans l'espace environnant. Cette hypothèse nécessite davantage d'exploration *in situ* pour tenter de détecter et mesurer dans l'eau de mer la contamination chimique chronique à laquelle sont exposées les huîtres perlières.

Par ailleurs, l'approche méthodologique visant à produire des MP perlicoles a démontré toute la complexité et les limites de cette démarche expérimentale. En effet, bien que des précautions aient été prises pour limiter la production de particules nanométriques, il s'est avéré que la production de MP perlicoles impliquait aussi la production de NP. Ce travail a néanmoins permis d'insister sur la nécessité (pour les publications adoptant cette méthode de production de MP par cryoboyage et tamisage) de systématiquement caractériser la fraction nanométrique et de cibler un verrou méthodologique auquel ce type d'approche est confronté. Il s'agit d'interactions physico-chimiques et électrostatiques très complexes entre les particules qui évoluent en fonction de leurs tailles, du media dans lequel elles se trouvent et de leurs concentrations. Ces interactions provoquent un auto-assemblage des particules (*i.e.* agrégation) qui empêche le

passage et l'élimination des particules plus petites au moment du tamisage. Les résultats préliminaires témoignent que le protocole permet d'obtenir une distribution bimodale des particules avec un premier pic proche de la fraction d'intérêt (*i.e.* 8-60 µm) mais aplati par un second pic (principal) dans la fraction nanométrique associé à la présence de MNP < 2,6 µm qui représentent près de 50% des particules produites. La caractérisation de la distribution des tailles de particules s'avère donc indispensable (i) pour vérifier la production de NP, leur abondance et leur comportement et (ii) pour permettre une meilleure visibilité des paramètres d'exposition lorsque ces particules sont utilisées dans des études d'écotoxicologie. Les MNP perlicoles produits dans ce travail sont en cours d'analyse à l'IMMM afin d'avoir une caractérisation plus fine des tailles de particules par granulométrie laser. Ces analyses seront complétées par un suivi du comportement des MNP perlicoles dans l'eau de mer en essayant de recréer des conditions proches de celles testées lors de l'exposition des huîtres perlières (*i.e.* 0,025 et 1 µg.L^{-1} avec ajout de microalgues). En effet, des phénomènes d'homo- et hétéroagrégation des MNP dans le milieu de conditionnement des huîtres auraient très bien pu intervenir pendant l'expérimentation modifiant ainsi les paramètres d'exposition.

Enfin, une seconde phase d'exposition des huîtres perlières impliquant les MNP perlicoles a été conduite sur une période de 5 mois. Les résultats physiologiques ont révélé une augmentation significative de l'ingestion ainsi qu'une diminution significative de l'efficacité d'assimilation chez les animaux exposés à 1 µg.L^{-1}. Cependant, c'est à la dose de 0,025 µg.L^{-1} qu'une baisse significative du gain d'énergie a pu être observée. Ces résultats sont liés au fait que les individus exposés à 0,025 µg.L^{-1} n'ont pas modifié leur alimentation malgré une efficacité d'assimilation en baisse. À l'inverse, les huîtres exposées à 1 µg.L^{-1} ont compensé cette baisse d'efficacité d'assimilation en augmentant l'ingestion, phénomène déjà observé sur l'huître creuse, *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2016). Ce mécanisme met en exergue la capacité biologique des individus exposés à 1 µg.L^{-1} de subvenir à leurs besoins nutritionnels en s'alimentant davantage pour pallier la baisse d'assimilation induite par la présence des MNP. Néanmoins, cette dynamique métabolique s'inscrit dans un cadre expérimental en laboratoire où l'alimentation n'est pas limitante (*i.e.* apport continu de microalgues). Dans un contexte écologique, ce phénomène de compensation ne serait probablement pas durable puisqu'il dépend entièrement de l'alimentation disponible dans le milieu. L'analyse histologique des gonades n'a révélé aucune altération de la gamétogénèse mais des mesures de glycogène dans le muscle sont en cours pour savoir si les réserves énergétiques des huîtres exposées ont été impactées par cette altération du métabolisme énergétique. Au niveau moléculaire, l'analyse des données transcriptomiques est toujours en cours. Celle-ci a déjà permis d'identifier dans le manteau, le sac perlier et les hémocytes près de 499, 140 et 203 gènes différentiellement exprimés (DEG), respectivement, entre les huîtres exposées aux MNP perlicoles et les huîtres témoins. À l'issue de l'expérimentation, la qualité des perles récoltées auprès des individus

exposés a été significativement impactée au niveau de la microstructure. En effet, une diminution significative des fronts de recouvrement a été constatée sur les perles issues des individus exposés à 0,025 µg.L^{-1} ainsi qu'une diminution significative et dose-dépendante de l'épaisseur des tablettes d'aragonite dans les conditions 0,025 et 1 µg.L^{-1}. D'autres résultats annexes n'ont pas été présentés dans l'article 6 en raison de leur caractère spéculatoire. Ces résultats concernent la présence de particules à la surface d'une perle issue d'un individu exposé à la concentration de 1 µg.L^{-1} (**Figure 39**A-B). La métalisation de l'échantillon qui est nécessaire pour effectuer ce type d'observation au microscope électronique à balayage (MEB) n'a effectivement pas permis d'effectuer de plus amples analyses quant à la nature de ces particules. Néanmoins, il est possible que ces particules correspondent aux MNP perlicoles présents dans le milieu de conditionnement des huîtres perlières. Ils auraient pu pénétrer dans la poche perlière (i) directement après la greffe en passant par l'incision que réalise le greffeur (pour introduire le nucléus et le greffon) avant que l'huître ne cicatrise et/ou (ii) par la translocation des plus petits MP et/ou NP à travers les voies paracellulaires (comme explicité par Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018 dans les tissus de *P. maximus*). Cependant, compte tenu de la taille des particules observées à la surface de la perle **Figure 39**A (*i.e.* jusqu'à 30-50 µm), l'hypothèse d'une translocation paraît difficile pour expliquer ce phénomène. Dans tous les cas, la présence des MNP dans la poche perlière et le sac perlier pourrait résulter en une inflammation impactant la biominéralisation, mais également en l'apparition de défauts de surface. La dispersion des particules observées dans le cas présent à la surface de la perle (**Figure 39**A) s'apparente d'ailleurs à certains défauts observés sur une autre perle issue de la condition 0,025 µg.L^{-1} (**Figure 39**C). Ces défauts n'ont jamais été observés auparavant. La présence de « picots » à la surface de la perle suggère que des particules ont été emprisonnées dans le sac perlier pendant la formation de la perle puis recouverte par les dépôts de nacre. L'interprétation de la **Figure 39**A est plus complexe car les particules sont visibles en surface suggérant une contamination extérieure à la surface de la perle. Cependant, elle témoigne par endroit que le recouvrement des particules a déjà débuté à travers une colonisation par des nucléis d'aragonite (**Figure 39**B). Cette organisation n'est pas habituelle car la nucléation s'organise en « fronts » alors que quelques nucléis sont dispersés sur la particule. Bien que peu convaincante, l'analyse photographique des MNP perlicoles utilisés pour l'expérimentation est le seul moyen actuel pour tenter de faire le lien avec ces particules (**Figure 39**D). En revanche, la présence des MNP dans la poche perlière et le sac perlier semble être confirmée par la récolte des keshis. En effet, la récolte réalisée à l'issue de l'expérimentation nous a révélé une production de keshis significativement plus élevée dans la contition à 1 µg.L^{-1} par rapport au contrôle. Étant donné qu'aucun keshi n'a été récolté dans la condition contrôle, leur origine semble être associée à la présence des MNP. Ces keshis sont en cours d'analyse par l'ANSES (LSA, Boulogne-Sur-Mer) et un travail préliminaire a permis de mettre en évidence la présence d'une particule incluse dans la structure minérale d'un keshi (**Figure 40**A-C). Sa

taille et sa couleur violette (**Figure 40**C) se rapproche beaucoup des MNP perlicoles produits à partir des cordes utilisées pour cette expérimentation (**Figure 40**D-E). Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de démontrer que les MNP perlicoles représentent une menace pour la biologie de *P. margaritifera* avec des effets potentiellement néfastes pour la qualité de la perle. Des approches écologiques en mésocosmes (*i.e.* reconstitution d'un habitat récifal) sont désormais nécessaires pour tester l'impact global sur le maintien des populations et la durabilité de la perliculture polynésienne tout en abordant la complexité des MNP (*i.e.* type, forme, additifs, biofilm, etc.).

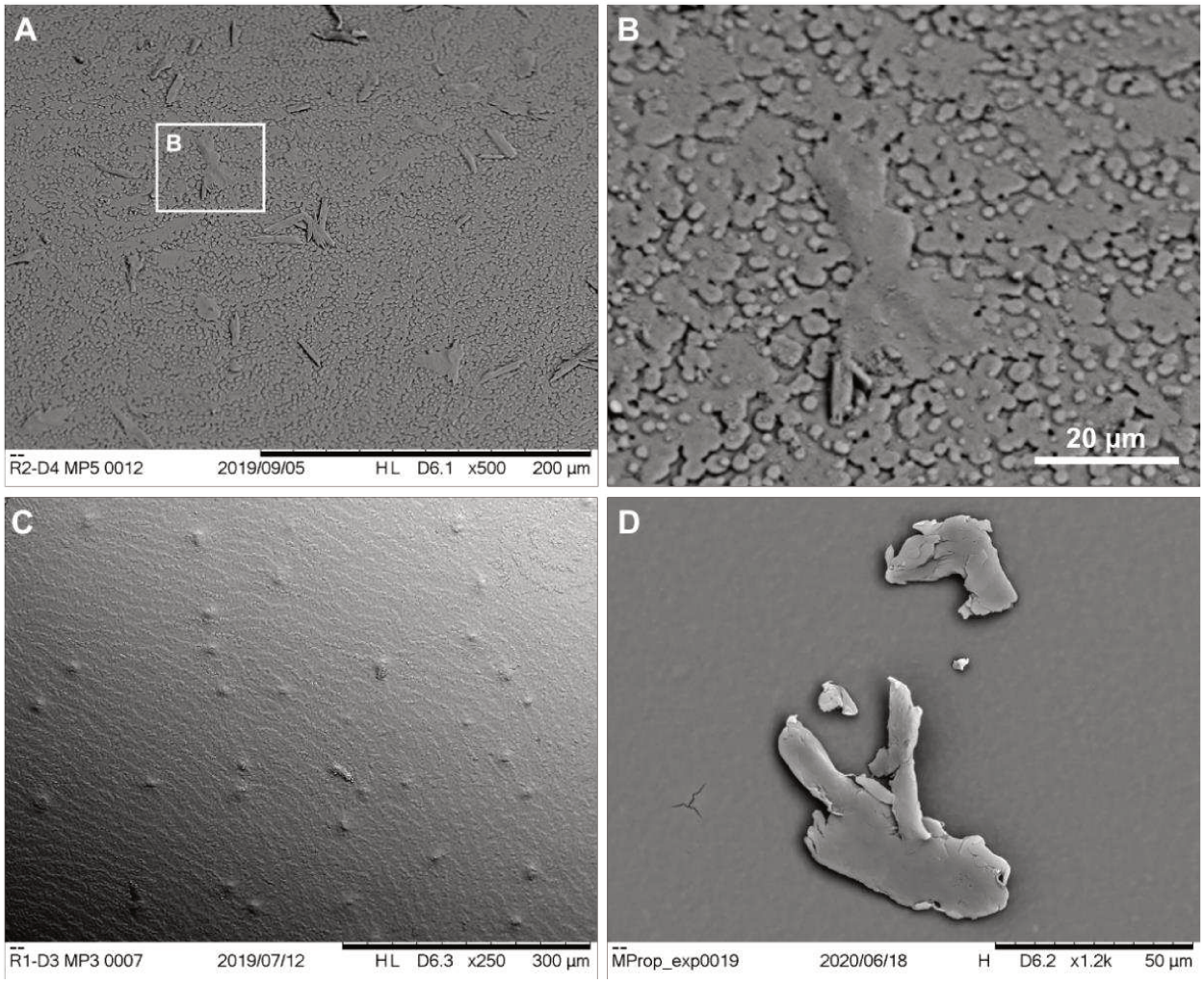


Figure 39. Photographies au MEB réalisées à la surface de deux perles (**A**-**C**) récoltées chez des huîtres perlières exposées aux MNP perlicoles (**D**). Perle issue d'une huître perlière exposée à la concentration de (**A**-**B**) 1 µg.L^{-1} et (**B**) 0.025 µg.L^{-1}. La photographie B est un agrandissement effectué à partir de la photographie A.

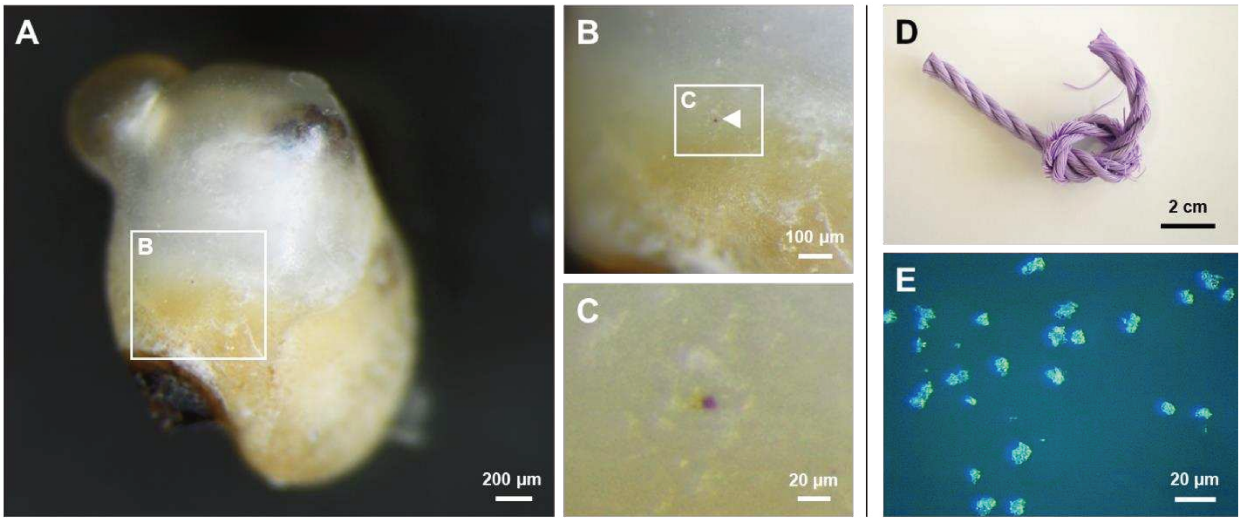


Figure 40. Observation d'une particule incluse dans la matière minérale d'un keshi (**A**-**C**) récolté dans une huître perlière exposée aux MNP perlicoles dont les caractéristiques semblent correspondre aux microplastiques produits à partir du cordage (**D**-**E**).

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VI – DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, l'augmentation du nombre de publications scientifiques et d'articles de vulgarisation sur la pollution plastique et ses impacts environnementaux a favorisé la sensibilisation du grand public à cette problématique et suscite un intérêt grandissant. Alors que la demande et la production mondiale de plastique ne cessent d'augmenter depuis 70 ans, les déchets plastiques continuent de s'accumuler dans l'environnement et tout particulièrement dans les océans (Jambeck *et al.*, 2015). Aujourd'hui, cette mauvaise gestion des déchets plastiques est à l'origine d'une pollution omniprésente, microscopique et invisible dont les possibles conséquences pour l'environnement naturel et la santé humaine soulèvent l'inquiétude (Galloway *et al.*, 2017 ; Wright et Kelly, 2017). Afin de quantifier l'ampleur de cette menace, de nombreuses études ont été réalisées sur le terrain. Une majorité fait notamment état d'une abondance croissante du nombre de MP au fur et à mesure que leur taille diminue (*e.g.* Bergmann *et al.*, 2017 ; Peeken *et al.*, 2018) pouvant atteindre des tailles nanométriques d'après certaines données expérimentales (Lambert et Wagner, 2016 ; Gigault *et al.*, 2016). Cependant, en raison de verrous méthodologiques, la quantification et la caractérisation des particules < 10 µm n'est pas encore possible (Schwaferts *et al.*, 2019). Ces données sont pourtant primordiales pour évaluer les risques présents et futurs associés aux MNP de la manière la plus réaliste et la plus exhaustive possible. En effet, les preuves scientifiques actuelles sont loin d'être robustes en ce qui concerne l'impact réel des MNP sur la biodiversité. En outre, comme l'a déclaré Rochman (2016b), l' « *Histoire nous a appris que la motivation pour une nouvelle politique environnementale est beaucoup plus forte lorsque l'impact écologique est démontré* » en prenant l'exemple des restrictions relatives aux émissions de gaz à effet de serre associées à l'acidification des océans. Au vu de l'ampleur de la contamination plastique des océans, il apparait comme essentiel de connaître l'impact de celle-ci sur l'environnement et les organismes marins. Or, malgré les données de contaminations *in situ* disponibles, les données expérimentales démontrant l'impact des MNP sur les êtres vivants sont encore trop restreintes car elles ne prennent pas en compte la dimension complexe et diverse de la contamination *in situ*. En effet, de nombreuses études en laboratoire ont permis de démontrer l'impact des MNP à différentes échelles biologiques (*i.e.* moléculaire, cellulaire, individuelle, populationnelle et écosystémique) (Galloway *et al.*, 2017) en utilisant souvent des micro- et nanobilles modèles qualifiées de « standards ». Néanmoins, bien que ces particules standardidées présentent divers avantages (*e.g.* parfaitement calibrées, caractérisées, facilement traçables) et permettent la compréhension des mécanismes de toxicité associés à ce type de MNP (que l'on peut retrouver dans certains usages tels que les cosmétiques), elles manquent clairement de pertinence écologique ; les MP étant beaucoup plus variés en conditions réelles (*i.e.* formes, tailles, types

de polymères, caractéristiques de surface et composition chimique) (Phuong *et al.*, 2016 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). De la même manière, ces études ont généralement été réalisées en se basant sur des concentrations massiques de MP *in situ* sans pour autant considérer la distribution réelle des tailles de particules et donc leur concentration numéraire (Lenz *et al.*, 2016). Il existe donc une dissemblance entre les conditions d'exposition aux MNP testées en laboratoire et les conditions réelles d'exposition, celles-ci étant bien plus complexes et associées à de nombreux facteurs confondants (*e.g.* effets physiques, chimiques, (micro)biote et polluants chimiques associés, etc.). Ainsi, cela souligne toute la complexité d'étudier l'impact réel des MNP sur les écosystèmes marins et l'importance de s'approcher autant que possible de la réalité environnementale, essentielle pour la compréhension et l'aide à la décision.

Dans ce contexte global, la problématique de cette thèse, bien que spécifique à la situation de la Polynésie française, est également extrapolable à l'échelle de la communauté scientifique. Il s'agissait en premier lieu d'**évaluer la contamination microplastique dans les lagons perlicoles polynésiens** puis d'**évaluer son impact sur l'huître perlière à différents niveaux d'organisation biologique incluant la qualité de la perle**, ressource culturelle et économique majeure de la Polynésie française. Cette approche constituait ainsi le volet innovant de ce travail de thèse puisqu'elle a impliqué (i) une approche toxicologique visant à caractériser le potentiel de toxicité chimique des structures perlicoles dans l'objectif (ii) de mettre en place un protocole de production de MP issus de ces stuctures et (iii) d'en tester les effets sur l'huître perlière par la mise en place d'une expérimentation se rapprochant le plus possible d'une réalité environnementale lagonaire estimée de concert dans ce travail.

1. La contamination microplastique dans les lagons perlicoles, une menace pour l'huître perlière et l'écosystème lagonaire

Les résultats de mes travaux réalisés dans les lagons perlicoles de Ahe, Manihi et Takaroa ont démontré l'omniprésence des MP dans l'eau de mer et les tissus d'huîtres perlières en élevage (*Chapitre III*, article 1). En effet, les concentrations en MP (0,2 à 8,4 MP.m^{-3}) issus d'échantillonnage en surface > 335 µm font état d'une contamination plaçant ces trois atolls à une position défavorable par rapport aux concentrations mesurées dans le monde (**Figure 41**). De plus, ce travail a permis d'identifier la colonne d'eau comme étant le compartiment lagonaire le plus contaminé avec des concentrations en moyenne 95 fois plus élevées que celles enregistrées en surface (14,0 à 716,2 MP.m^{-3}). Bien que cette comparaison soit mitigée en raison des différentes méthodes (*i.e.* filet manta *vs* filet à plancton) et mailles (*i.e.* 335 µm *vs* 40 µm) d'échantillonnage utilisées, ces données sont nettement plus pertinentes d'un point de vue écologique. En effet, les concentrations mesurées dans la colonne d'eau sont moins sous-

estimées que celles issues des prélèvements de surface d'une part, grâce à un échantillonnage sur maille plus fine (*i.e.* 40 µm) et d'autre part, parceque la couche de surface est régulièrement brassée par le vent entraînant une distribution verticale des MP et une sous-estimation des MP flottants (Kukulka *et al.*, 2012). De plus ce compartiment lagonaire représente un intérêt écologique puisque les MP qui y sont présents correspondent aux particules biodisponibles pour les huîtres perlières élevées entre 4 et 6 mètres de profondeur. Ainsi, des informations sur les niveaux d'exposition des huîtres ont été obtenues. Il s'agissait alors d'étudier la nature de cette contamination *via* la caractérisation et l'identification des MP. Ce travail a révélé que les MP étaient majoritairement noirs et dominés par les polymères PE et PP (et co-polymère PE-PP) dans l'eau de mer ansi que dans les tissus de *P. margaritifera*. Or, certaines structures utilisées en perliculture ont des caractéristiques semblables, notamment les cordes (majoritairement noires et de nature PE, parfois PE-PP), utilisées abondamment pour la confection des lignes d'élevage et de collectage, et les collecteurs de naissain (*i.e.* les « ombrières de collectage » noires et de nature PP, parfois PE-PP) (*Chapitre III*, article 1). Ce matériel pourrait ainsi être une source significative de MP de type PE et PP identifiés dans nos échantillons. Néanmoins, d'autres campagnes d'échantillonnages sont requises afin de déterminer et de quantifier l'implication réelle des objets de la perliculture dans la contamination en microplastiques des lagons perlicoles. Pour cela, l'évaluation de la contamination microplastique dans des lagons non-perlicoles semble être un bon moyen de comparaison puisqu'il permettrait d'apprécier la part attribuable à d'autres activités comme la pêche, le tourisme ou encore l'implication des activités domestiques. Il serait donc pertinent d'analyser un grand nombre de lagons pour multiplier les sites d'étude, en mettant en covariable le nombre d'habitants, le nombre de filières d'élevage, la pression touristique, les mesures de gestion des déchets, etc., et ainsi adopter une approche de type épidémiologique pour mieux appréhender les différentes sources (Pernet *et al.*, 2018). Les empreintes chimiques dans la fraction colloïdale associées aux MP et aux structures perlicoles pourraient également être utilisées comme point de comparaison pour vérifier la concordance des polymères (Ter Halle *et al.*, 2017). Il est également important de tenir compte de la contamination MP en provenance de l'extérieur, notamment celle qui converge vers le gyre du Pacifique sud. En effet, Eriksen *et al.* (2013) ont signalé plus de 50 000 MP.km^{-2} près de l'île de Rapa Nui située à moins de 4 500 km de Tahiti. Cette contamination océanique pourrait également faire l'objet d'un suivi dans les eaux de Polynésie française.

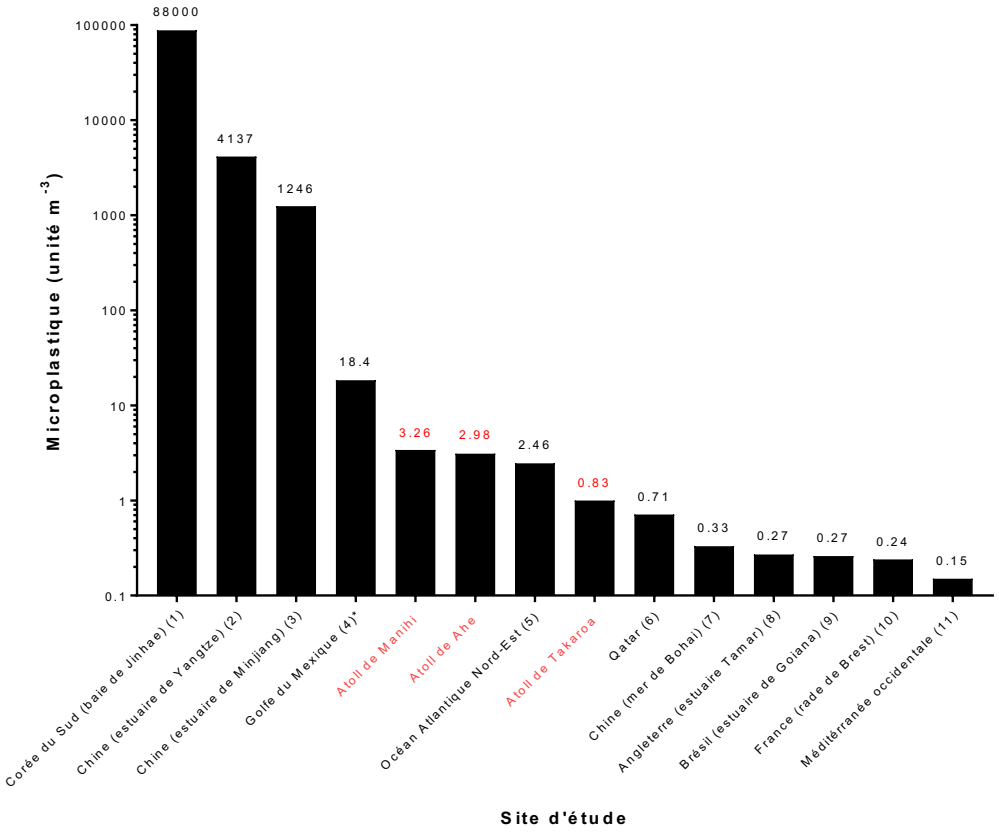


Figure 41. Comparaison entre les concentrations moyennes en microplastiques mesurées dans les eaux de surface (> 335 µm) des atolls de Ahe, Manihi et Takaroa et celles mesurées dans différents sites dans le monde. Il est important de noter que la concentration moyenne mesurée à Takaroa pourrait provenir d'un biais associé à l'échantillonnage réalisé en conditions de vent fort (~ 20 km.h^{-1}) qui aurait entraîné une distribution verticale des MP et par conséquent une sous-estimation des concentrations en surface. (1) Song *et al.*, 2015b ; (2) Zhao *et al.*, 2014 ; (3) Zhao *et al.*, 2015 ; (4) Di Mauro *et al.*, 2017 ; (5) Lusher *et al.*, 2014 ; (6) Castillo *et al.*, 2016 ; (7) Zhang *et al.*, 2017 ; (8) Cole *et al.*, 2014 ; (9) Lima *et al.*, 2014 ; (10) Frère *et al.*, 2017 ; (11) de Lucia *et al.*, 2014. *La valeur issue de Di Mauro *et al.* (2017) correspond à une concentration maximale enregistrée dans le Golfe du Mexique.

D'autre part, l'analyse de la distribution des tailles de MP dans la colonne d'eau a démontré la dominance da la fraction 20-200 µm (> 90%) comprise dans la gamme de taille de rétention de *P. margaritifera* qui se situe entre 2 et 200 µm (Pouvreau *et al.*, 1999). Je me suis alors intéressé à la contamination microplastique dans les tissus d'huîtres perlières dont les concentrations ont atteint entre 2,1 et 125 MP.g^{-1} de chair sèche (représentant environ 0,3-21,5 MP.g^{-1} de chair humide). Ces mesures sont très élevées par rapport aux concentrations moyennes quantifiées dans les tissus d'autres bivalves marins rencontrées dans la littérature (**Figure 42**). Cependant, ces concentrations coïncident avec le degré de contamination mesuré dans l'eau de mer des lagons perlicoles et la forte capacité de filtration de *P. margaritifera* pouvant atteindre près de 26 L.h^{-1}.g^{-1} de poids sec (Yukihira *et al.*, 2000 ; Pouvreau *et al.*, 2000) ; la rendant ainsi d'autant plus vulnérable à la contamination microplastique. Cela signifie qu'en

se basant sur un MP (sphérique) de 20 µm, une huître perlière de 12,5 cm de hauteur pourrait ingérer entre 0,26 et 0,42 mg de MP par jour. Dans l'ensemble, ces travaux confirment les inquiétudes des autorités locales et interpellent quant aux menaces qui pèsent sur l'huître perlière et plus largement pour la vie marine et l'écosystème lagonaire. Pour appréhender ce risque, j'ai donc étudié la réponse de *P. margaritifera* face à ce facteur de stress en conditions expérimentales.

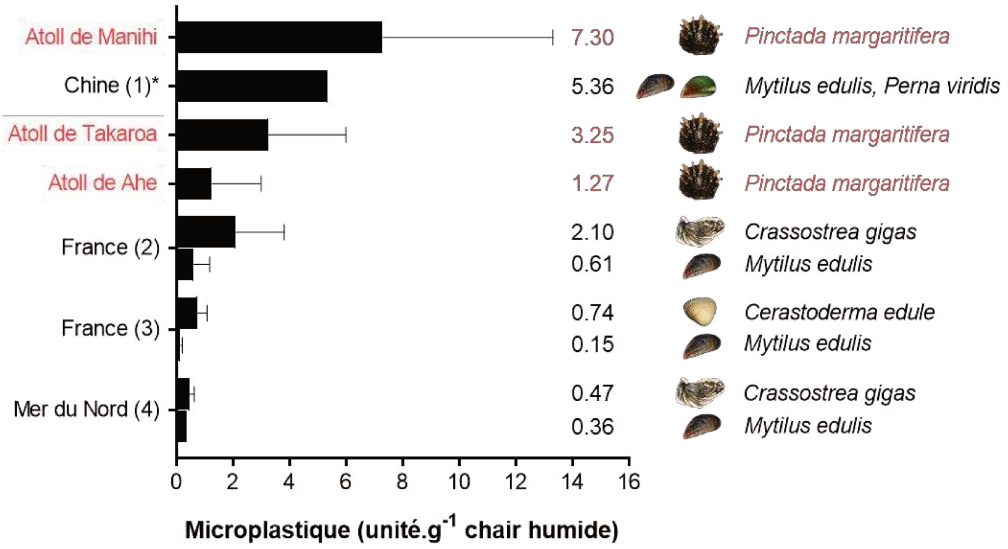


Figure 42. Comparaison entre les concentrations en microplastiques mesurées dans les tissus de l'huître perlière (*Pincatada margaritifera*) échantillonné à Ahe, Manihi et Takaroa et celles mesurées chez d'autres espèces de bivalves marins dans le monde. Moyenne ± écart-type. (1) X. Qu *et al.*, 2018 ; (2) Phuong *et al.*, 2018 ; (3) Hermabessiere *et al.*, 2019 ; (4) Van Cauwenberghe et Janssen, 2014. *La valeur issue de X. Qu *et al.* (2018) correspond à une concentration maximale enregistrée chez *M. edulis* et *P. viridis* échantillonnés sur les côtes chinoises. Il est important de noter que la comparaison de ces travaux de thèse en lien avec la littérature est à mitiger car elle ne tient pas compte de la gamme de taille des microplastiques quantifiés (pour Ahe, Manihi et Takaroa, MP > 20 µm).

2. Les microplastiques impactent l'huître perlière à différentes échelles biologique suite à l'altération de son métabolisme énergétique

Pour mieux comprendre l'impact des microplastiques sur l'huître perlière, il est nécessaire d'étudier l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques impliqués dans son cycle vital. Celui des organismes hétérotrophes dépend étroitement de (i) leur capacité à prélever dans

leur milieu de vie l'énergie nécessaire *via* leur alimentation et (ii) l'ensemble des processus assurant la gestion de cette énergie à différents niveaux d'organisation biologique. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectifs d'identifier et de comprendre les réponses liées au métabolisme énergétique de l'huître perlière par une approche multi-échelle intégrant des réponses moléculaires, cellulaires et individuelles pour évaluer le risque potentiel des MP sur le maintien de l'individu. Pour répondre à ces objectifs, deux expérimentations *in vivo* ont été menées en conditions contrôlées de laboratoire. Une première exposition des huîtres perlières a été réalisée pour décrypter les processus métaboliques et transcriptomiques impliqués dans la réponse au stress MP à travers l'utilisation de MP modèles (microbilles standardisées en PS). Tirant profit de ces travaux et des données de contamination microplastique obtenues dans les lagons perlicoles, une seconde expérimentation a ensuite été réalisée pour simuler un scenario plus environnemental impliquant des MNP issus d'objets perlicoles produits expérimentalement à des concentrations massiques *in situ* en MP. Cette approche visait à étudier et comparer les réponses métaboliques et transcriptomiques préalablement testées en incorporant une approche fonctionnelle supplémentaire en lien avec les processus de biominéralisation et notamment la qualité de la perle.

En premier lieu, l'ingestion et l'efficacité d'assimilation (*i.e.* processus par lequel les nutriments sont absorbés dans l'organisme après l'ingestion d'aliments et leur digestion dans l'intestin) sont considérées comme les principaux processus responsables du gain d'énergie chez les bivalves (Hawkins *et al.*, 1999). Le suivi de ces paramètres au cours des deux expérimentations a permis de mettre en évidence un effet significatif dose-dépendant des MP sur l'efficacité d'assimilation des animaux (*Chapitre IV* et *V*, article 2 et 6, respectivement). Cela signifie qu'à volume égal d'eau filtrée par les huîtres, l'assimilation des microalgues a été perturbée par la présence des MP dans le tractus digestif de l'animal et/ou dans l'eau environnante. En effet, cet effet inhibiteur des MP sur l'assimilation des aliments peut se produire soit directement, par interférence avec les processus d'assimilation au sein du système digestif et/ou indirectement, par compétition avec les microalgues présentes dans le milieu de conditionnement. Par exemple, Besseling *et al.* (2013) ont pu démontrer que la diminution de l'efficacité d'assimilation observée chez le vers marin (*A. marina*) était corrélée à la réduction de la teneur en matière organique dans le sédiment due à la présence de MP. Aussi, il a été constaté que des réponses inflammatoires combinées à un temps de résidence plus long des MP dans l'intestin et une réduction de l'alimentation seraient à l'origine d'un épuisement des réserves énergétiques chez *A. marina* (Wright *et al.*, 2013a). Il est donc possible que l'ingestion de MP chez *P. margaritifera* aient entraîné des troubles digestifs liés à un brassage inadéquat des aliments avec les enzymes digestives. Ces troubles auraient pu être occasionnés par un temps de rétention trop long des MP entraînant un encombrement du tractus digestif de l'animal

(Kolandhasamy *et al.*, 2018) et/ou des réponses inflammatoires induites par des lésions partielles de la paroi intestinale (Wright *et al.*, 2013b ; Lei *et al.*, 2018).

Cependant, la baisse de l'efficacité d'assimilation n'a pas été gérée par les animaux de la même manière selon les conditions d'exposition. En effet, dans le cas de l'exposition aux MNP perlicoles à 1 µg.L^{-1} (concentration massique dite « *in situ* » mais correspondant à environ 3,8 × 10^5 particules.L^{-1} pour des tailles comprises à minima entre 0,4 et 60 µm), les animaux ont compensé leur baisse d'efficacité d'assimilation par une hausse de l'ingestion (*Chapitre V*, article 6). Cela n'a pas été observé à la dose intermédiaire de 0.025 µg.L^{-1} (~ 9.5 × 10^3 particules.L^{-1}), ce qui pourrait s'expliquer par une baisse insuffisante de l'efficacité d'assimilation pour stimuler le déclenchement d'un mécanisme compensatoire chez les individus exposés à cette condition. Cela n'a également pas été observé dans l'expérimentation impliquant les microbilles de PS, malgré des doses d'expositions parfois supérieures (*i.e.* 2,5 et 25 µg.L^{-1}). Néanmoins, un phénomène comparable a été décrit chez l'huître creuse (*C. gigas*) après 2 mois d'exposition à des microbilles de PS (2 et 6 µm à 23 µg.L^{-1}) avec une augmentation de l'activité de filtration, conséquence supposée d'une réduction d'entrée d'énergie observée (Sussarellu *et al.*, 2016). Outre le fait que *C. gigas* puisse avoir des capacités d'adaptation différentes de *P. margaritifera* et/ou des besoins énergétiques différents (puisque *C. gigas* était en pleine phase de gamétogénèse dans cette expérimentation et donc un besoin énergétique maximal et primordial), dans notre cas, il est possible que les délais qui ont séparé le début des expositions et le début des mesures métaboliques (*i.e.* un mois concernant l'exposition aux micro-PS) aient pu empêcher l'observation de ce phénomène lors de l'exposition à 25 µg.L^{-1}, pourtant proche de celle testée par Sussarellu *et al.* (2016). En effet, la dynamique compensatoire de l'homéostasie interne varie dans le temps en fonction du stress, de son intensité et de l'organisme (Sokolova, 2013 ; Karin *et al.*, 2016). Ainsi, cette compensation alimentaire aurait pu avoir eu lieu durant le mois précédent les mesures métaboliques sans que cela soit mis en évidence, losque les individus exposés avaient encore les ressources énergétiques suffisantes pour leur maintenance. En effet, il est également envisageable qu'un stress cellulaire (*i.e.* induit par une sur-production d'espèces réactives de l'oxygène, ROS), engendré par les micro-PS aux doses plus élevées, ait fini par limiter énergétiquement *P. margaritifera* à faire face à cette baisse d'assimilation. Par ailleurs, la nature des MP utilisés lors des deux expérimentations pourrait également expliquer les différentes réponses observées chez *P. margaritifera*. En effet, la taille et la forme des MP influencent leur temps de rétention et leur potentiel d'accumulation. Par exemple, la forme sphérique et lisse des microbilles de PS facilite le transit à l'intérieur du système digestif de l'organisme contrairement aux fragments de formes irrégulières tels que les MNP perlicoles (Mazurais *et al.*, 2015 ; Frydkjær *et al.*, 2017 ; Paul-Pont *et al.*, 2018). Ces derniers seraient bien plus dommageables pour la paroi intestinale (*e.g.* perforations intestinales qui se traduisent par diverses lésions des cellules de l'épithélium) pouvant mettre à mal les

capacités digestives de l'animal dont l'efficacité d'assimilation. Ces dommages seraient d'autant plus accentués par la présence des NP, connus pour être plus toxiques et plus inflammatoires que les MP (Lee *et al.*, 2013 ; Jeong *et al.*, 2016), notamment par leur capacité à pouvoir se transloquer à travers les membranes digestives vers le système circulatoire et d'autres organes (Mattsson *et al.*, 2017 ; Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018). Nos expérimentations soulignent ainsi la diversité des réponses de l'huître perlière face au stress MP et sa faculté à mettre en place de possibles mécanismes compensatoires pour y palier en fonction de l'intensité et de la nature de ce stress (*i.e.* concentration et nature des MNP, durée d'exposition, etc.). Il est également important de souligner qu'une telle compensation alimentaire n'est possible qu'en conditions de laboratoire avec une alimentation non-limitante (*ad libitum*). En effet, ce mécanisme est beaucoup moins envisageable en conditions *in situ* considérant l'oligotrophie de l'environnement lagonaire (Buestel et Pouvreau, 2000) ce qui pourrait conduire l'organisme à des conditions plus accrues de stress énergétique.

En condition de stress, un organisme aquatique peut mettre en place divers mécanismes physiologiques et métaboliques qui se traduisent par une hausse des dépenses énergétiques (Guderley et Pörtner, 2010). Si ce coût énergétique n'est pas compensé par une hausse équivalente des apports énergétiques, l'organisme est contraint à sacrifier une partie de l'énergie normalement allouée aux fonctions telles que la croissance et/ou la reproduction. Le concept de « tolérance au stress limitée par l'énergie » décrit par Sokolova (2013) est un caractère essentiel qui en fait une variable explicative privilégiée pour l'évaluation des effets induits par tous types de stress. En l'occurrence, à l'exception de la condition à 1 $\mu g.L^{-1}$ (MNP perlicoles), la diminution de l'efficacité d'assimilation induite par les micro-PS et les MNP perlicoles n'a pas été compensée par une augmentation de l'ingestion, ni même par une réduction de la consommation d'oxygène (*Chapitre IV* et *V*, article 2 et 6, respectivement). De ce fait, ce déséquilibre entre apports et coûts énergétiques s'est répercuté sur le bilan énergétique des animaux à travers une diminution du gain net d'énergie. Un déficit énergétique a même été mesuré chez les huîtres exposées aux micro-PS à 25 $\mu g.L^{-1}$ (*Chapitre IV*, article 2). Théoriquement, un gain d'énergie équivalant à zéro reflète un arrêt de la croissance pour l'individu, tandis qu'un déficit énergétique indique que les coûts métaboliques associés à l'entretien de l'individu (*i.e.* respiration, métabolisme et reproduction) l'emportent sur l'énergie fournie par l'ingestion de nourriture, mettant en danger la survie de l'individu. Cependant, les résultats issus des deux études n'ont démontré aucun impact sur la croissance coquillère de l'huître perlière qui était donc maintenue, malgré la diminution de gain d'énergie. Par conséquent, la seule possibilité pour ces individus de compenser leur diminution de gain d'énergie est de puiser l'énergie manquante dans un autre compartiment physiologique tel que les réserves énergétiques (*i.e.* glycogène stocké dans le muscle) et de réduire l'allocation comme par exemple celle allouée à la reproduction. Cet impact sur l'effort reproducteur a été démontré chez *C. gigas* pour qui la production de gamètes est

totalement dépendante de l'entrée d'énergie. En effet, suite à la réduction de gain d'énergie observée chez les huîtres exposées aux micro-PS, la quantité d'ovocytes produits par ces individus a été diminuée de 38% par rapport aux animaux non exposés (Sussarellu *et al.*, 2016).

La gamétogenèse chez les bivalves représente une phase énergétique coûteuse. Chez *P. margaritifera*, la reproduction est continue. Cette « stratégie opportuniste » consiste à investir tout excès d'énergie dans la production de gamètes (Pouvreau *et al.*, 2000). L'analyse histologique des gonades a révélé une gamétogénèse anormale chez certains individus exposés aux micro-PS avec des zones de régression suspectées et des stades de régression avancée (*Chapitre IV*, article 2). Ainsi, l'incapacité des huîtres perlières à conserver le même rythme d'acquisition de l'énergie s'est certainement répercutée sur la reproduction des animaux ouvrant la voie à des infiltrations hémocytaires et la régression des gonades par l'arrêt de la prolifération goniale. Curieusement, le réseau de veille zoosanitaire de la DRM a révélé une baisse de recrutement des naissains ainsi qu'une gamétogénèse anormale généralisée parmi des individus d'élevage provenant de l'atoll de Takaroa. Cette gamétogénèse anormale observée en histologie s'apparente à nos résultats, notamment par des infiltrations hémocytaires (données non publiées). Ces observations témoignent d'une altération physiologique d'individus échantillonnés *in situ* et mettent en exergue l'implication d'un ou plusieurs facteur(s) de stress (*e.g.* nourriture, température, MP, polluants chimiques, etc.). Pour autant, aucune répercution sur la gamétogénèse n'a été observée chez les individus exposés aux MNP perlicoles (*Chapitre V*, article 6). Néanmoins, des mesures de glycogène dans le muscle sont en cours pour tenter de savoir si les individus (notamment ceux de la condition 0,025 $\mu g.L^{-1}$) auraient trouvé l'énergie manquante dans le stock de glycogène musculaire.

Au-delà de ce résultat, la démarche visant à s'approcher de la réalité environnementale a conduit à s'intéresser à la toxicité inhérente des plastiques perlicoles, de sorte à appréhender la toxicité chimique que pourront représenter les MNP sur les huîtres *in vivo* mais aussi les conséquences que pourraient représenter leur amoncellement à l'échelle des lagons. L'approche toxicologique menée sur les plastiques perlicoles (*i.e.* cordage et collecteur) a permis de démontrer expérimentalement que ces structures peuvent nuire au développement embryo-larvaire de *P. margaritifera* par le lessivage de composés toxiques tels que des polluants environnementaux mais aussi et surtout des additifs (*Chapitre V*, article 4). Ces additifs, majoritairement représentés par des phtalates, sont présents en grande quantité dans les structures neuves et pourraient représenter un risque écotoxicologique pour les organismes marins (Hermabessiere *et al.*, 2017). En extrapolant les concentrations de phtalates mesurées à l'échelle d'une station de collectage de 200 m de long composée de cordes (135 kg) et de collecteurs (39 kg), la lixiviation de phtalates estimée d'après mes résultats expérimentaux (*i.e.* 184 $mg.g^{-1}$ et 6,3 $mg.g^{-1}$, respectivement) suppose qu'une station de collectage peut libérer, au

moins, 25 g de phtalates pendant son utilisation (*i.e.* 3 à 5 ans). En 2019, environ 562 tonnes de lignes d'élevage ont été estimées dans le lagon de Takapoto. Cela représente donc 80 kg de phtalates potentiellement lixiviés et/ou lixiviables (sans compter la lixiviation d'autres structures en plastique telles que les bouées, les attaches en nylon, les grillages et les paniers), *i.e.* une contamination en phtalates de 60 $ng.L^{-1}$, compte tenu du volume du lagon (soit 1,4 km^3 ; Rougerie, 1979). Les phtalates sont considérés comme des perturbateurs endocriniens capables d'altérer la reproduction et le développement (Kay *et al.*, 2013 ; C. Wang *et al.*, 2016). Dans un contexte environnemental où les cordes et les collecteurs de naissains sont en contact direct avec les jeunes stades de vie de *P. margaritifera* (*i.e.* les plus sensibles), leur potentiel de toxicité chimique peut être un des éléments contributeurs aux dysfonctionnements observés *in situ* sur la reproduction de l'espèce et notamment la baisse du recrutement larvaire. Des recherches futures devraient être consacrées à la détection dans l'eau de mer (*e.g.* à l'aide de capteurs passifs pour identifier la contamination chimique chronique à laquelle sont exposées les huîtres perlières) et tester l'hypothèse que les zones d'élevage et d'accumulation des structures plastiques (opérationnelles et abandonnées) peuvent être considérées comme des « hotspots » de désorption de composés toxiques par rapport à d'autres sources lagonaire issues de l'usage des habitants, du tourisme ou d'autres activités professionnelles. Par ailleurs, bien que les MNP perlicoles soient issus de structures usagées (*Chapitre V*, article 5), qui se sont révélées moins toxiques que les structures neuves (*Chapitre V*, article 4), cette toxicité chimique est à considérer pour l'ensemble des résultats présentés dans l'étude impliquant les MNP perlicoles ; non pas par la lixiviation des produits chimiques dans le milieu de conditionnement, mais plutôt à travers leur désorption suite à l'ingestion des MNP (Koelmans *et al.*, 2016 ; Rochman, 2016a). En effet, plusieurs études en laboratoire ont démontré que les MP ingérés peuvent être vecteurs de produits chimiques types polluants organiques (*e.g.* PBDE, PCB) et additifs plastifiants pour l'organisme (*e.g.* Besseling *et al.*, 2013 ; Browne *et al.*, 2013 ; Rochman *et al.*, 2013b ; Chua *et al.*, 2014 ; Bakir *et al.*, 2016 ; Hartmann *et al.*, 2017). Ce facteur n'a pas été évalué dans le cas de mon travail. Dès lors, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de désorption des produits chimiques (Koelmans *et al.*, 2016), identifiés dans les lixiviats, dans les tissus de *P. margaritifera* après l'ingestion de MNP perlicoles. Cette étude expérimentale permettrait d'affiner nos connaissances sur les effets observés et de démêler leur origine respective en ciblant les différents facteurs confondants impliqués dans cette réponse au stress MP.

Plusieurs études ont démontré que la contamination MNP génère des effets toxiques au niveau subcellulaire en interagissant avec les processus métaboliques et/ou en générant des dommages aux biomolécules (revue dans Prokić *et al.*, 2019). Les effets délétères induits par les MNP apparaissent donc initialement au niveau moléculaire. Dans ce travail, la mise en place de réponses compensatoires pour contrer ces effets délétères a été confirmée au niveau transcriptionnel. En effet, nos résultats ont permis de mettre en évidence dans le manteau de *P.*

margaritifera, une modulation des niveaux d'expression pour des gènes impliqués dans la détoxification des xénobiotiques (*e.g. glutathione-S-transferase*, *gst*) et dans les défenses antioxydantes (*e.g. heat shock protein*, *hsp*) quelle que soit la concentration en micro-PS après 2 mois d'exposition (*Chapitre IV*, article 3). Des gènes tels que *gst* sont des acteurs centraux dans les mécanismes de détoxification et notamment l'élimination des ROS. La production de ROS est généralement accrue en cas de stress environnemental du fait d'une activité cellulaire aérobie importante. Leur sur-production est considérée comme universelle au stress MNP (Fu *et al.*, 2014) et peut entraîner des conséquences néfastes sur l'homéostasie de l'hôte et son équilibre métabolique (Donaghy *et al.*, 2015 ; Manduzio *et al.*, 2015). L'activation du système de défenses antioxydantes a d'ailleurs été observée à la condition 0,25 $\mu g.L^{-1}$ à travers une sur-expression des gènes *hsp70* et *hsp71*, impliqués dans la protection de l'intégrité et du fonctionnement des protéines contre le stress oxydatif (Pörtner, 2012). En outre, la sous-expression de *gst* observée dans toutes les conditions micro-PS pourraient traduire une incapacité des individus exposés à maintenir des voies de détoxification appropriées sur le long terme. L'hypothèse pour une telle altération est la baisse progressive de l'énergie disponible observée chez ces animaux. La baisse de l'énergie disponible est d'ailleurs en adéquation avec la diminution du nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) (*Chapitre IV*, article 2 et 3). Ce lien semble être confirmé dans l'expérimentation exposant les MNP perlicoles avec un nombre de DEG moins important dans la condition 0,025 $\mu g.L^{-1}$ par rapport aux individus exposés à 1 $\mu g.L^{-1}$ qui ont maintenu leur niveau énergétique grâce au mécanisme de compensation alimentaire. Cette tendance est mise en évidence dans le manteau, le sac perlier et les hémocytes (*Chapitre V*, article 6). Les fonctions biologiques des DEG impliqués dans cette dernière expérimentation sont en cours d'identification ce qui permettra *in fine* de confirmer cette hypothèse avec en plus des informations concernant l'expression génique dans le sac perlier et les hémocytes.

Les résultats de l'analyse transcriptomique des hémocytes permettra d'approfondir la réponse immunitaire dose-spécifique observée dans le manteau des individus exposés aux micro-PS à la dose de 0,25 $\mu g.L^{-1}$ impliquant une sur-expression du gène *myd88* (*myeloid differentiation primary response 88*) (*Chapitre IV*, article 3). En effet, le gène *myd88* est impliqué dans la cascade de gènes initiée par l'activation des récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors*, TLR) qui jouent un rôle crucial dans le système immunitiare inné en reconnaissant les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes de type bactérien. Néanmoins, bien que cette sur-expression du gène *myd88* suggère l'implication des micro-PS comme vecteur de pathogènes chez les huîtres exposées, une sous-expression de TLR13 a été observée dans la même condition (*i.e.* micro-PS 0,25 $\mu g.L^{-1}$). De plus, l'approche par metabarcoding n'a révélé aucune différence de charge bactérienne (*i.e.* aucune variation de la diversité, ni des communautés) dans les bacs de mélanges de microalgues avec et sans micro-PS (préparés quotidiennement

pour l'exposition des huîtres). Par conséquent, l'inactivation de TLR et l'absence de différence de charge bactérienne supposent que l'activation spécifique de Myd88 n'a pas été déclenchée par des agents pathogènes bactériens dans cette étude (*Chapitre IV*, article 3). Par ailleurs, Myd88 est aussi connue chez les bivalves comme étant une protéine essentielle au chemin d'activation des hémocytes et des gènes de défense (*e.g.* cytokines) de la voie moléculaire NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) impliquée dans la réponse immunitaire mais aussi la réponse au stress cellulaire (*e.g.* Ning *et al.*, 2015 ; Xin *et al.*, 2016). Ainsi, sa sur-expression dans la condition 0,25 $\mu g.L^{-1}$ pourrait expliquer les défenses antioxydantes mises en place pour contrer la production de ROS observée chez ces individus (*Chapitre IV*, article 3). La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du déclenchement de la réponse immunitaire chez l'huître perlière est primordiale au vue de l'émergence des études sur les MP comme agents pathogènes (Zettler *et al.*, 2013 ; Keswani *et al.*, 2016 ; Kirstein *et al.*, 2016), absorbants de métaux lourds et de polluants organiques persistants (Barletta *et al.*, 2019) (Barletta *et al.*, 2019 ; Vedolin *et al.*, 2018) et même récemment, réservoirs insoupçonnés d'antibiotiques (Imran *et al.*, 2019 ; Yang *et al.*, 2019). Ces paramètres sont d'autant plus importants à prendre en compte aux regards des propriétés chimiques des structures perlicoles utilisées pour la production des MNP.

L'analyse transcriptomique des hémocytes et du manteau chez les huîtres exposées aux MNP perlicoles pourrait également permettre de comprendre l'origine des malformations coquillères observées à la suite de l'exposition. En effet, les barrières anatomiques (*e.g.* manteau), les hémocytes (*e.g.* phagocytes) mais également le statut physiologique font partie de la première ligne de défense dans la réponse immunitaire innée des mollusques contre les particules et les organismes étrangers (Al-Khalaifah et Al-Nasser, 2018). Ainsi, les transcriptomes des hémocytes et du manteau pourraient apporter des éléments de réponse sur une éventuelle déficience immunitaire des animaux exposés aux MNP, qui, couplée à l'altération de leur métabolisme énergétique, les auraient rendu moins résistant au parasitisme tel que le vers *Polydora spp.*, à l'origine de la majorité des défauts sévères observés (Liu *et al.*, 2017) (*Chapitre V*, article 6). Les malformations sous la forme de petits trous (*Chapitre V*, article 6) pourraient également être induites par la présence des MNP perlicoles au travers d'une altération des cellules épithéliales du manteau (Al-Khalaifah et Al-Nasser, 2018). En effet, des anomalies de biominéralisation de la coquille sous forme de trous et/ou des aspérités de surface ont également été observées chez des larves-D de *C. gigas* après une exposition à des nano-PS-NH_2 de 50 nm (Tallec, 2019). Des profils transcriptomiques obtenus par Balbi *et al.* (2017) suggèrent également une altération de la production de carbonate de calcium chez les embryons de moule *M. galloprovincialis* exposés à des nano-PS-NH_2 de 50 nm.

Globalement, les résultats de ces approches intégratives permettent de qualifier les réponses obtenues chez les huîtres perlières exposées aux micro-PS et MNP perlicoles en les transposant sur le modèle de Sokolova (2013). Chez les individus exposés aux micro-PS à 2,5 et 25 µg.L^{-1}, des signes physiologiques et moléculaires typiques des conditions environnementales de type « pessimum » ont été révélées (*i.e.* stress extrême ; Sokolova, 2013) (**Figure 43**). Pour les huîtres exposées aux MNP perlicoles (*i.e.* 0,025 et 1 µg.L^{-1}), la baisse de leur efficacité d'assimilation traduit un statut physiologique proche de celui des animaux exposés aux micro-PS à 0,25 µg.L^{-1} et typique des conditions environnementales de type « pejus » (*i.e.* stress modéré ; Sokolova, 2013) (**Figure 43**). Malgré des mécanismes de compensation alimentaire développés à la concentration de 1 µg.L^{-1}, ces résultats sont préoccupants car observés dans des conditions expérimentales optimales en termes de nourriture (*ad libitum*), d'oxygène, et de température. Ces paramètres sont variables dans les conditions environnementales, conduisant à un contexte de stress multiples avec des effets synergiques qui pourraient avoir un impact plus profond sur les organismes marins (Ferreira *et al.*, 2016 ; Wen *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant d'étudier les interactions de multiples facteurs de stress (*i.e.* exposome) impliquant l'exposition aux MP dans le contexte de changement climatique pour prédire la résilience des populations et améliorer les plans de conservation. Néanmoins, l'élaboration d'une telle expérimentation nécessite en amont d'adresser et de comprendre toute la complexité des mécanismes de toxicité associés aux MNP que l'on pourrait déjà qualifier d'« exposome MNP ».

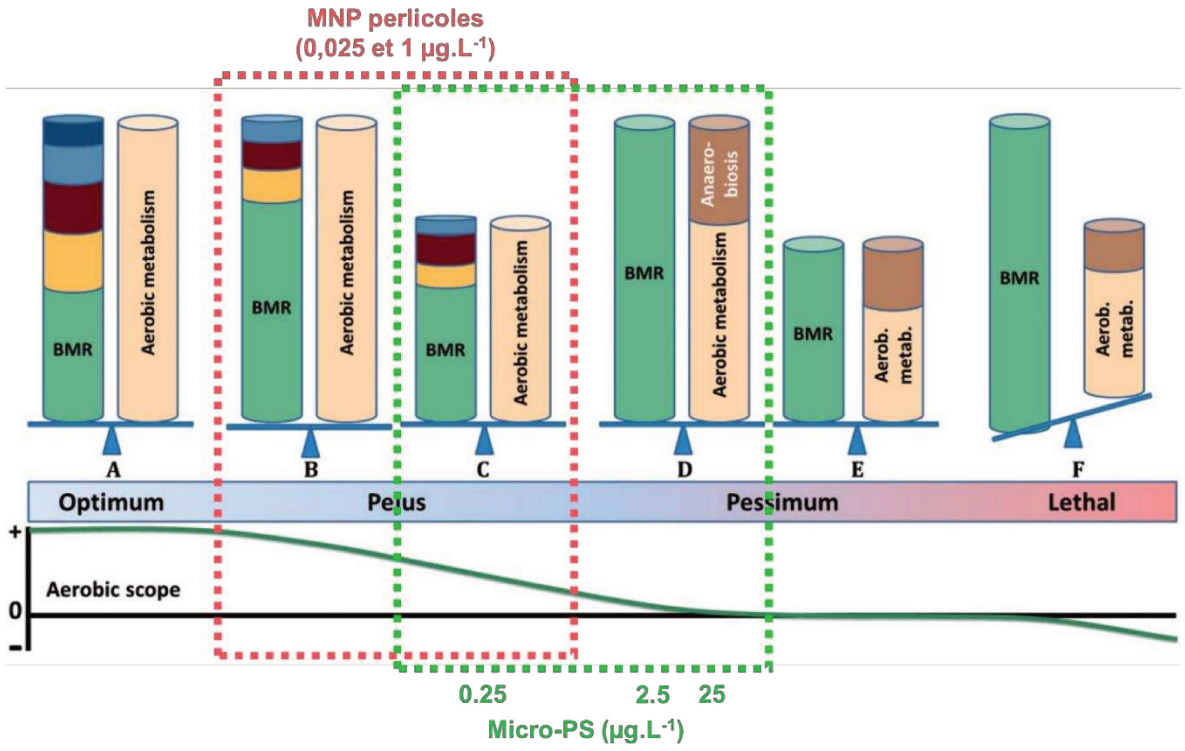


Figure 43. Projection des statuts métaboliques de l'huître perlière (*P. margaritifera*) selon les conditions microplastiques testées expérimentalement en conditions contrôlées de laboratoire d'après le concept de tolérance

au stress limité par l'énergie décrit par Sokolova (2013). Les cadres en pointillés représentent les projections des statuts métaboliques de *P. margaritifera* à la suite des expositions aux micro-PS (en vert) et MNP perlicoles (en rouge). Les fonctions exigeantes en énergie sont indiquées sur le côté gauche de chaque échelle et sont composées de (bas en haut) : entretien de base (en vert), activité (en jaune), reproduction/maturation (en rouge foncé), croissance/développement (en bleu clair) et la mise en réserve d'énergie (en bleu foncé). L'allocation d'énergie aux différentes fonctions varie selon les espèces et les stades de vie, mais la taille des cases correspondantes ne reflète pas l'énergie réelle allouée à ces fonctions. L'ATP pour ces processus est fournie *via* le métabolisme aérobie (en beige) et anaérobie (en marron) indiqué sur le côté droit de chaque échelle. Dans la plage optimale (**A**), la portée aérobie est maximale et l'apport d'ATP aérobie est suffisamment élevé pour couvrir les coûts métaboliques de base (BMR) et investir dans l'activité, la croissance, la reproduction et le développement. L'excès d'énergie est mis en réserve sous forme de glycogène ou de lipides. Lors d'un stress modéré de l'ordre du « pejus », les coûts de maintenance augmentent et répondent aux demandes d'énergie supplémentaire pour se protéger du stress et pour réparer les dommages (**B**), ou (selon le facteur de stress) l'assimilation des aliments et/ou la capacité du métabolisme aérobie sont altérées (**C**) conduisant à une baisse du potentiel aérobie. Le stockage d'énergie est absent ou réduit dans ces conditions. Lors d'un stress extrême de l'ordre du « pessimum », l'augmentation progressive de la demande d'ATP pour l'entretien et/ou l'altération progressive du métabolisme aérobie l'emportent sur l'apport d'ATP *via* le métabolisme aérobie (**D**). La portée aérobie disparaît et le métabolisme passe à une anaérobiose partielle qui alimente les coûts de maintenance essentiels et soutient la survie limitée dans le temps de l'organisme. Chez certaines espèces, la survie dans la plage du « pessimum » peut être améliorée par une dépression du taux métabolique (**E**) qui réduit les taux de renouvellement de l'énergie au détriment de l'arrêt des fonctions exigeantes en ATP qui ne sont pas essentielles à la survie immédiate. Il convient de noter que l'équilibre énergétique est temporairement perturbé lors des transitions entre les plages « optimum », « pejus » et « pessimum », mais est finalement rétabli lorsque l'organisme s'acclimate à ces conditions. Dans la gamme « lethal » des conditions environnementales (**F**), l'équilibre de l'offre et de la demande d'ATP est perturbé de façon permanente, ce qui entraîne un potentiel aérobie négatif et la mort de l'organisme ; cela se produit en présence ou en l'absence d'un arrêt métabolique. La gamme « pejus » correspond à un stress modéré, et les gammes « pessimum » et « lethal » à un stress extrême. La survie à long terme de la population n'est possible que dans les fourchettes « optimum » et « pejus », bien que des transitions temporaires vers l'intervalle « pessimum » puissent être tolérées, à condition que la durée passée par l'organisme dans les conditions « optimum » et « pejus » soit suffisante pour permettre son développement, sa croissance et sa reproduction. *Modifié d'après Sokolova (2013) – Integrative and Comparative Biology.*

Dans l'ensemble, les approches intégratives réalisées lors de ces expérimentations m'ont permis de démontrer que les MP impactent le métabolisme énergétique de l'huître perlière dont l'altération se répercute à différentes échelles biologiques de l'organisme. Ainsi, je me suis intérrogé sur cette altération énergétique et les conséquences sur les processus de biominéralisation pouvant affecter *in fine* la formation et la qualité de la perle.

3. La qualité de la perle impactée par les microplastiques

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié pour la première fois l'impact que pouvait avoir les MNP sur les processus de biominéralisation et la qualité de la perle. L'allocation d'énergie

dans les processus de biominéralisation s'est déjà révélée impactée après une réduction d'entrée d'énergie modulée par la température et la disponibilité en nourriture (Joubert *et al.*, 2014 ; Le Moullac *et al.*, 2018). Cependant, malgré la carence énergétique observée chez les individus exposés aux micro-PS, l'approche transcriptomique réalisée dans cette première étude n'a démontré aucune incidence sur l'expression des gènes clés impliqués dans la biominéralisation (Joubert *et al.*, 2010 ; Yarra *et al.*, 2016) (*Chapitre IV*, article 3). Afin d'apporter des éléments de réponses aux questions que peuvent se poser les autorités de la Polynésie française et les perliculteurs face à la menace plastique, j'ai simulé le cycle de production d'une perle dans le cadre de la seconde expérimentation impliquant les MNP perlicoles. Cette étude a permis de démontrer un impact important des MNP sur la qualité de la perle et notamment au niveau de la microstructure des dépôts nacriers. En effet, une diminution significative de l'espacement des fronts de recouvrement a été observée à la surface des perles issues des individus exposés à la condition 0,025 $\mu g.L^{-1}$. Aussi, une diminution significative dose-dépendante de l'épaisseur des tablettes d'aragonite aux concentrations 0,025 et 1 $\mu g.L^{-1}$ a pu être démontrée (*Chapitre V*, article 6). D'après Latchere *et al.* (2018), le niveau de nourriture n'a aucune influence sur l'épaisseur des tablettes d'aragonite, suggérant que cette réduction de l'épaisseur des tablettes n'est pas influencée par la diminution du gain d'énergie. Cependant, compte tenu de l'influence du métabolisme énergétique sur la croissance coquillère (Joubert *et al.*, 2014) positivement corrélée aux dépôts nacriers à la surface de la perle (Le Pabic *et al.*, 2016) chez *P. margaritifera*, l'hypothèse associée au dérèglement énergétique et son implication dans mes résultats ne doit pas être écartée (S. Li *et al.*, 2016). En effet, il a été suggéré chez l'huître perlière *Pinctada fucata* (S. Li *et al.*, 2016) et le corail *Acropora millepora* (Moya *et al.*, 2012) que les mécanismes de régulation de l'homéostasie en réponse à l'augmentation de CO_2 et de température sont susceptible d'impacter les processus de biominéralisation en consommant l'énergie normalement allouée à cette fonction. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes (*e.g.* stress oxydatif) impliqués dans les processus de biominéralisation et le rôle du métabolisme énergétique dans la microstructure des dépôts nacriers à la surface de la perle. Paradoxalement, la structure plus fine des tablettes d'aragonites est préférable aux tablettes plus épaisses, au moins en fin de cycle, car des tablettes fines formées à la surface de la perle favoriseraient un meilleur lustre et des couleurs d'interférences (Muhammad *et al.*, 2017). Cependant, cet impact important sur la microstructure des dépôts nacriers a été observé en laboratoire après 3 mois d'exposition aux MNP alors que le cycle de production d'une perle se déroule sur une période de 18 mois. Il est donc concevable qu'un effet aussi marqué puisse être exacerbé sur le long terme suite à une exposition prolongée aux MNP. Des conséquences importantes induites par des conditions de stress thermique ont déjà été démontrées chez *P. margaritifera* se traduisant par un arrêt de production de dépôts nacriers (Le Moullac *et al.*, 2018). Ainsi, l'impact induit par les MNP sur les dépôts nacriers

pourrait avoir *in fine* une incidence sur la production de perles. Par ailleurs, ces travaux ont également permis de mettre en évidence la présence de particules à la surface d'une perle issue d'un individu exposé à la concentration de 1 µg.L^{-1}. Il est possible que ces particules correspondent aux MNP perlicoles présents dans le milieu de conditionnement des huîtres perlières. Leur implication semble être confirmée par la récolte des keshis dont la production s'est avérée significativement plus élevée dans la condition à 1 µg.L^{-1} par rapport au contrôle (aucun keshi récolté) (*Chapitre V*, article 6). Ces keshis sont en cours d'analyse par le laboratoire LSA de l'ANSES (Boulogne-Sur-Mer) pour tenter de sortir une signature polymérique de type PE et/ou PP. Un travail préliminaire a déjà permis de mettre en évidence par microscopie la présence d'une particule inclue dans la structure minérale d'un keshi. Sa taille et sa couleur violette se rapprochent beaucoup des MNP produits à partir du cordage. Ainsi, les MNP auraient pu pénétrer dans la poche perlière (i) directement après la greffe en passant par l'incision que réalise le greffeur (pour introduire le nucléus et le greffon) avant que l'huître ne cicatrise et/ou (ii) par la translocation des plus petits MP et/ou NP à travers les voies paracellulaires (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018). Dans tous les cas, la présence de MNP dans la poche perlière et le sac perlier pourrait résulter en une inflammation impactant la biominéralisation, mais également en l'apparition de défauts de surface. Dans l'ensemble, ces résultats ont démontré que la contamination MNP pourrait avoir des conséquences négatives sur la qualité de la perle et donc la filière perlicole en Polynésie française.

4. Des expérimentations toujours plus réalistes

Les résultats de l'expérimentation s'approchant le plus possible des conditions environnementales lagonaires (*i.e.* MNP perlicoles) ne sont que préliminaires et la notion de risque associée aux MP doit être interprétée en considérant les extrapolations relatives à cette démarche expérimentale. En effet, les scénarios que j'ai testés doivent se rapprocher davantage de la réalité environnementale. Les résultats des campagnes d'échantillonnages font état d'une contamination microplastique diversifiée qui suggère l'implication de sources multiples dont les origines restent méconnues. Une attention particulière doit être accordée à cette diversité et toute la complexité qu'elle représente à l'échelle environnementale de manière à pouvoir évaluer correctement le risque réel qui pèse sur l'huître perlière et l'écosystème lagonaire.

Bien entendu, l'approche la plus pertinente pour conduire des expérimentations réalistes serait d'utiliser des MNP collectés directement dans les lagons perlicoles. Toutefois, cette approche représente un véritable challenge technique et méthodologique pour plusieurs raisons. Premièrement, nous sommes incapables aujourd'hui d'échantillonner et d'isoler les MNP < 10 µm. Cette contrainte conduirait à des expositions très restreintes en termes de tailles de particules testées et surtout limitante vis-à-vis du mode d'alimentation des modèles biologiques

(*i.e.* généralement des organismes filtreurs se nourrissant de petites particules). Deuxièmement, les expérimentations en laboratoire qui se veulent écologiquement pertinentes impliquent des expositions chroniques permettant d'approcher les effets induits par les MNP sur le long terme. Cela nécessiterait un approvisionnement en MNP considérable et donc un gros effort de prélèvement et de traitement d'échantillons pour isoler les particules. Troisièmement, pour garantir une bonne transparence des paramètres d'exposition, les MNP doivent être caractérisés pour connaître leurs propriétés physico-chimique (*i.e.* tailles, formes, polymères, produits chimiques et (micro)biote associé, etc.) et quantifiés (**Figure 44**). Ces paramètres sont extrêmement variables au regard de l'hétérogénéité des MP *in situ* (Rochman *et al.*, 2019), conduisant à des expérimentations difficilement reproductibles. Pour ces raisons, l'échantillonnage des MNP *in situ* ne permet pas en l'état actuel des connaissances de répondre aux exigences des conditions expérimentales en laboratoire dont le but est de comprendre les mécanismes de toxicité tout en se rapprochant le plus possible des conditions réelles d'exposition (**Figure 44**).

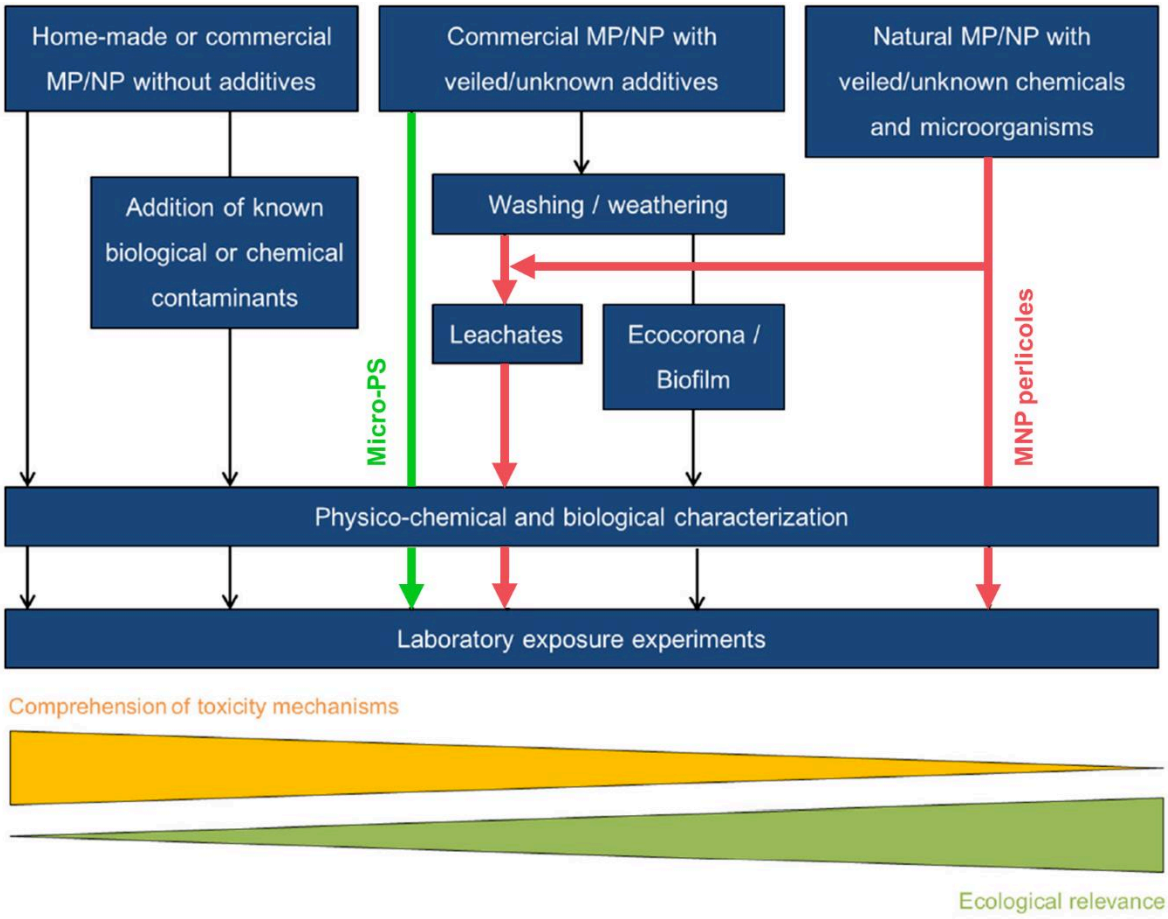


Figure 44. Schéma illustrant l'importance de la nature des particules plastiques utilisées en écotoxicologie dans le degré de compréhension des mécanismes de toxicité et la notion de pertinence écologique. Les flèches vertes et rouges positionnent respectivement les expérimentations implicant les micro-PS et les MNP perlicoles illustrant ainsi

la plage de compréhension des mécanismes de toxicité et la pertinence écologique de ces travaux (*Chapitre IV* et *V*, article 2, 3 et 6). La caractérisation et la toxicité chimique des plastiques perlicoles ont été abordées *via* l'utilisation de lixiviats sur le développement embryo-larvaire de *P. margaritifera* (*Chapitre V*, article 4). *Modifié d'après Paul-Pont et al. (2018) – Frontiers in Marine Science.*

Par conséquent, la production de MNP à partir de macrodéchets récoltés *in situ* a semblé être un bon compromis (**Figure 43**). En effet, bien que les cordes et les ombrières de collectage ne soient pas les seules sources potentielles de MP, ces structures perlicoles sont (i) des déchets abondamment retrouvés dans les lagons perlicoles (Andréfouët *et al.*, 2014), (ii) dont la nature (*i.e.* polymère) correspond aux MP les plus abondants identifiés dans les échantillons *in situ* (*Chapitre III*, article 1) et (iii) font partie de l'habitat de *P. margaritifera*. Ainsi, cette expérimentation a mobilisé deux types de polymères (*i.e.* PE et PP) ayant des propriétés physico-chimiques et toxicologiques distinctes qui ont été caractérisées (**Figure 43** ; *Chapitre V*, article 4). Les formes produites étaient très irrégulières se rapprochant ainsi des fragments retrouvés en grande majorité dans les échantillons *in situ* (*Chapitre III*, article 1). Néanmoins, il est fort probable que les MNP produits à partir d'un cryobroyage ne se rapprochent pas exactement des MNP issus de la fragmentation naturelle des macrodéchets. En effet, cette dernière repose sur l'altération progressive de l'intégrité de surface des stuctures polymériques (**Figure 45**) induite par l'ensoleillement (rayons UV) et les processus d'oxydation et d'hydolyse (Andrady, 2011, 2017 ; Gewert *et al.*, 2015). La photodégradation jouerait d'ailleurs un rôle important dans les processus de fragmentation des matières plastiques en PE et PP (Song *et al.*, 2017). L'altération de la matrice polymère se traduit par un raccourcissement des chaînes de polymères et la lixiviation des additifs qui rendent les matières plastiques plus fragiles et stimulent la formation de fissures superficielles et la fragmentation par d'autres facteurs tels que l'abrasion du vent, des vagues, du sable, etc. (**Figure 45** ; Andrady, 2011, 2017 ; Ter Halle *et al.*, 2016). Bien que les structures perlicoles utilisées dans cette étude aient été fragilisées en surface lors de leur vieillissement *in situ*, elles ont été broyées intégralement. Ainsi, il est probable que les MNP perlicoles issus de la matrice polymère au centre des matériaux présentent une meilleure intégrité que ceux issus de la matrice superficielle (**Figure 45**). Il serait donc intéressant d'isoler les macrodéchets *in situ* tout en essayant de maintenir et/ou simuler les facteurs environnementaux (*e.g.* mesocosme) auxquels ils sont exposés et mettre en place un dispositif de collecte des MNP produits (Kalogerakis *et al.*, 2017 ; Hebner et Maurer-Jones, 2020 ; Gerritse *et al.*, 2020). Cette approche permettrait également de profiter du vieillissement des particules qui subissent des modifications de surface telles que la formation d'un eco-corona puis d'un biofilm (Galloway *et al.*, 2017) ainsi que des phénomènes d'homo- et/ou hétéroagrégation (Zhao *et al.*, 2017). Une étude récente a révélé que la formation d'eco-corona à la surface de nanobilles en PS (200 nm) diminuait la toxicité des particules à travers une réduction de la production de

ROS chez la microalgue *Chlorella spp.* (Natarajan *et al.*, 2020). Ces modifications de surface peuvent donc jouer un rôle important dans le comportement des particules (Tallec *et al.*, 2019), leurs interactions avec les organismes et leur toxicité (Rummel *et al.*, 2017 ; Tallec *et al.*, 2018). Cette caractéristique souligne l'importance de considérer les MNP à l'échelle écosystémique. Des études en microcosmes ont déjà démontré qu'une exposition aux MP pouvait altérer la filtration de l'huître plate (*Ostrea edulis*) ayant pour conséquences des impacts divers sur la biodiversité associée à cet écosystème reconstitué (*e.g.* diminution de la diversité des communautés benthiques, de la biomasse des producteurs primaires et des flux de nutriments) (Green, 2016 ; Green *et al.*, 2017). De ce fait, l'approche en mésocosme semble être un bon moyen pour conserver une certaine complexité environnementale tout en ayant un contrôle sur les paramètres expérimentaux (Sagarin *et al.*, 2016).

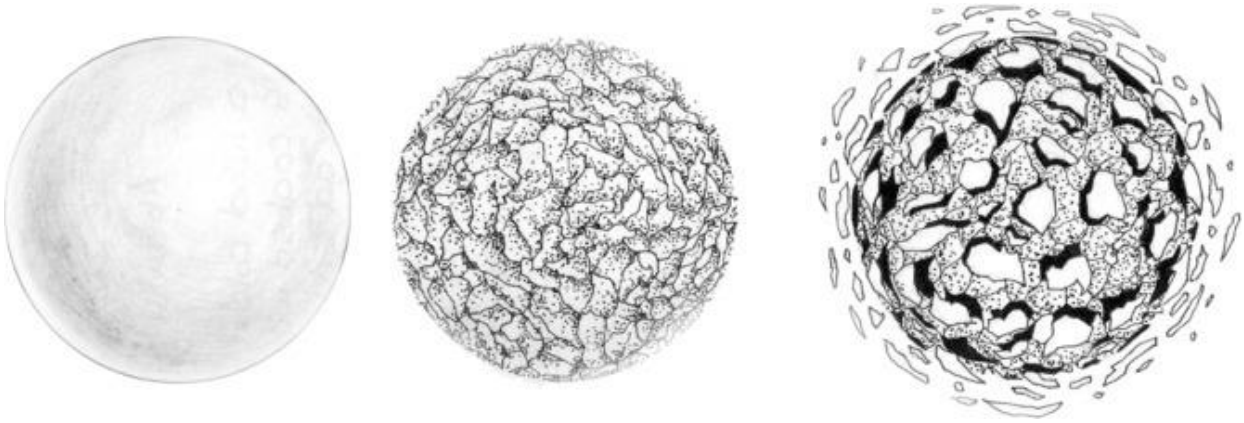


Figure 45. Représentation schématique du processus de fragmentation naturelle d'une sphère en plastique. À gauche : sphère en plastique neuve (état initial) ; au milieu : sphère en plastique usée par le temps et les éléments naturels (*e.g.* photodégradation, oxydation, hydrolyse) avec des fissurations étendues à toute sa surface ; à droite : sphère en plastique dont la couche superficielle se fragmente partiellement en micro- et nanoplastiques de tailles et de formes irrégulières. *D'après Andrady (2017) – Marine Pollution Bulletin.*

Toutefois, la véritable divergence entre mes conditions expérimentales et la réalité environnementale concerne l'extrapolation de mes concentrations *in situ*. En effet, la concentration massique de 1 µg.L^{-1} dite « *in situ* » testée dans mon étude correspond à la concentration massique (moyenne) enregistrée à Takaroa (*i.e.* 0,677 µg.L^{-1}). Cependant, cette dernière a été extrapolée à partir d'une concentration numéraire (*i.e.* 134,7 MP.m^{-3}) en se basant sur une particule sphérique de 20 µm qui ne représente pas la diversité des tailles de particules à laquelle cette concentration est réellement associée (*i.e.* majoritairement représentée par des particules allant de 20 à 200 µm ; *Chapitre III*, article 1). Pourtant, dans mon expérimentation, les huîtres perlières ont été exposées aux concentrations 0,025 et 1 µg.L^{-1} dont la distribution de tailles des particules était comprise entre 0,4 et 60 µm. Bien qu'une caractérisation plus fine soit

en cours à l'IMMM pour évaluer si des phénomènes d'agrégation en conditions d'exposition auraient pu modifier la gamme de taille testée, ce paramètre constitue le point faible de mon approche. Cette dissemblance entre les conditions réelles et les conditions testées est à considérer pour l'ensemble de mes résultats et interroge sur le degré de pertinence écologique de ma démarche expérimentale. En effet, malgré toutes les précautions mises en œuvre pour s'en prémunir, la méthodologie de production des MP doit faire l'objet d'améliorations pour limiter voire empêcher la production de NP (*Chapitre V*, article 5). Le simple fait de n'avoir aucune donnée concernant la contamination en MNP < 20 µm limite (i) nos connaissances quant à la réelle ampleur des niveaux d'exposition auxquels les huîtres perlières font face et (ii) notre aptitude à pouvoir recréer ces conditions. Néanmoins, des études réalisées sur le terrain témoignent que l'abondance des petites particules plastiques comprisent enre 10 et 110 µm augmente d'un facteur 1,96 (Enders *et al.*, 2015) à 2,13 (Erni-Cassola *et al.*, 2017) à mesure que leur taille diminue. Ainsi, en l'absence de données *in situ* pour des tailles < 20 µm, une part de cette étude écotoxicologique peut être considérée comme une approche toxicologique permettant d'acquérir des données relatives aux risques potentiels que peuvent représenter ces particules pour *P. margaritifera*. Dans un contexte où la thématique microplastique évolue rapidement, ces informations sont cruciales au regard de nos connaissances futures. En effet, bien qu'il soit requis d'effectuer des expérimentations les plus réalistes possible, les recherches fondamentales restent incontournables pour démêler l'origine exact des mécanismes de toxicité associés aux MNP (Paul-Pont *et al.*, 2018). Ici, j'ai réalisé une expérimentation en dose-réponse impliquant une dose « *in situ* » (*i.e.* 1 µg.L^{-1}) ainsi qu'une dose plus faible (*i.e.* 0,025 µg.L^{-1}) afin d'identifier une fenêtre de réponse à laquelle des phénomènes de toxicité sont observés. Dans les deux scénarios, nous avons pu constater un impact important sur la biologie de l'huître perlière et la qualité de la perle. De manière à pouvoir estimer le risque que représente les MNP pour l'environnement, Backhaus et Wagner (2020) ont développé un concept d'évaluation basé sur un rapport entre la concentration environnementale prédite et la plus forte concentration sans risque pour l'environnement. En tenant compte de nos résultats pour les deux concentrations testées, ce rapport est probablement proche (*i.e.* en considérant les effets observés à la concentration *in situ* de 1 µg.L^{-1}) voire supérieur (*i.e.* en considérant la concentration faible à 0,025 µg.L^{-1}) à « 1 », représentant un risque critique pour l'environnement. Aussi, ce statut ne devrait pas s'améliorer dans les scénarios futurs. En effet, les concentrations *in situ* en MP devraient augmenter les décennies à venir à cause du vieillissement constant des déchets plastiques immergés dans les environnements marins (Lebreton *et al.*, 2019) tels que les lagons perlicoles analysés ici. Il est donc primordial d'effectuer davantage de recherches dans la thématique, notamment sur le développement de technologies et méthodologies permettant de tracer et quantifier les MNP < 10 µm dans les matrices environnementales. Ces informations favoriseront l'émergence d'expérimentations rigoureuses qui permettront d'obtenir davantage de

données robustes. La multiplication de ces données permettra d'effectuer *in fine* une meta-analyse pertinente pour mieux évaluer le risque associé à la diversité et la complexité des MNP dans l'environnement (Paul-Pont *et al.*, 2018) qui n'est pas uniquement un contaminant dissous comme la communauté écotox à l'expérience d'étudier mais comporte une dimension particulière majeure à prendre en compte et très variable suivant les propriétés de surface, l'eco-corona, etc. Le travail réalisé au cours de cette thèse apporte les premiers éléments de réponse à cette menace émergente qui pèse sur l'huître perlière, l'économie de la filière perlicole et plus largement l'écosystème lagonaire. Ces informations constituent également une base solide pour faciliter l'aide à la décision des politiques locales relatives à la gestion des déchets plastiques en Polynésie française.

5. Vers le recyclage et la substitution des plastiques perlicoles

La pollution de l'environnement marin par les microplastiques suscite l'intérêt de la communauté politique internationale (GESAMP, 2015). Plusieurs stratégies régionales, nationales et internationales visent à empêcher et à réduire cette pollution mais aucune d'elles ne prévoit un niveau d'engagement à la mesure de l'ampleur et du rythme de croissance de ce problème (Borrelle *et al.*, 2020). En 2016, entre 19 et 23 millions de tonnes de déchets plastiques générés dans le monde (*i.e.* 11%) sont estimés être entrés dans les écosystèmes aquatiques. En tenant compte des engagements ambitieux fixés par les gouvernements actuels pour diminuer cette pollution, les émissions annuelles de déchets plastiques pourraient atteindre jusqu'à 53 millions de tonnes par an d'ici 2030 (Borrelle *et al.*, 2020). Ainsi, pour atteindre des niveaux d'émissions inférieurs à cette prévision, des efforts extraordinaires sont nécessaires pour transformer l'économie mondiale du plastique (Borrelle *et al.*, 2020). Une action coordonnée à l'échelle mondiale est donc urgente afin de (i) réduire la consommation de plastique, (ii) augmenter les taux de réutilisation, de collecte des déchets et de recyclage, (iii) étendre les systèmes d'élimination sécurisés et (iv) accélérer l'innovation dans la chaîne de valorisation du plastique (Lau *et al.*, 2020).

En Polynésie française, et plus particulièrement dans les lagons perlicoles, la première action à entreprendre repose sur la mise en place d'un plan de gestion des déchets issus de la perliculture. Par conséquent, une filière de collecte et de tri des déchets dans les îles et atolls perlicoles doit être établie afin de rapatrier les structures d'élevages inutilisées sur Tahiti pour être en mesure de les traiter. Cette démarche constitue une étape importante de sorte à juguler la pollution actuelle induite par la perliculture dans ces territoires insulaires. Ensuite, il peut être intéressant de trouver des matériaux de substitution aux plastiques perlicoles. Le projet « PERLIBIO » est actuellement en cours à l'Université de Polynésie Française afin de proposer des solutions alternatives aux collecteurs de naissain actuels beaucoup trop fragiles. Trouver

des matériaux de substitution plus résistants, durables et si possible biosourcés et biodégradables sont les objectifs de ce projet. Cependant, les termes « biosourcés » et « biodégradables » ne veulent par forcément dire indemne de toxicité pour l'environnement. En effet, ces matériaux peuvent être accompagnés de polymères pétrochimiques et/ou d'additifs toxiques. Le scandale des plastiques « oxo-dégradables » illustre parfaitement ces propos car vantés initialement pour promouvoir la protection de l'environnement (Cichy *et al.*, 2010). En réalité, il s'agit de plastiques produits à partir de polymères synthétiques auxquels sont ajoutés des additifs oxydants à base de sels et de métaux favorisant leur dégradation en morceaux plus petits pour accélérer leur fragmentation en mer (Rujnić-Sokele et Pilipović, 2017). Il s'est avéré que ces plastiques oxo-dégradables produisaient plus rapidement des MP, en plus grand nombre et par conséquent étaient davantage biodisponibles que les MP issus des polymères pétrochimiques classiques. Ainsi, le développement de matériaux biosourcés et biodégradables doit impérativement passer par des études d'éco-sécurité impliquant des tests de tenue en conditions marines accompagnés de tests écotoxicologiques comme par exemple le bioessai réalisé dans ce travail sur les structures perlicoles (*Chapitre IV*, article 4). Par ailleurs, des tests réalisés *in situ* sont actuellement en cours dans le cadre du projet PERLIBIO afin de déterminer l'efficacité des collecteurs « coupelles », couramment utilisés pour le captage de *C. gigas* et constitués d'un plastique plus robuste. Dans le cas d'un résultat positif, ce travail favorisera une première transition pour la filière perlicole vers ce nouveau type de collecteur moins fragile et réutilisable. Ensuite, la seconde étape repose sur l'établissement d'un prototype de collecteur « biologique » fait à partir de biomatériaux innovants (*e.g.* poudre de coquille de mollusque). Pour se faire, l'UPF a développé une collaboration avec l'institut de SCION (équipe « biochemicals and biopolymers »), localisé en Nouvelle-Zélande, qui possède toute l'expertise et l'infrastructure pour être en charge de la production de ces prototypes. L'objectif *in fine* est de produire des prototypes de collecteurs en biomatériaux qui rassembleront toutes les caractéristiques requises (*i.e.* bonne capacité de recrutement des naissains, innocuité pour l'huître perlière et la vie marine, résistant sur une période de collecte mais biodégradable à *posteriori*). Des pistes de transfert technologique seront ensuite explorées pour que la production de ces collecteurs biologiques puisse se faire localement en Polynésie française.

6. De nouvelles pistes à explorer

Des travaux de recherche et développement doivent impérativement être menés dans les projets futurs et si possible promouvoir une collaboration internationale et interdisciplinaire pour le partage des nouvelles connaissances dans la thématique. Cela encouragerait la création d'une plateforme scientifique mondiale sur la pollution plastique permettant de mutualiser les résultats et les avancées. Ainsi, cette démarche permettrait d'augmenter nos connaissances en limitant

la redondance des études scientifiques actuelles (Connors *et al.*, 2017) en se concentrant sur des pistes pertinentes qui favoriseront notre compréhension et l'obtention de données de qualité.

Dans la poursuite de ce travail de thèse, d'autres recherches ainsi que des améliorations techniques et méthodologiques s'imposent pour améliorer nos connaissances en ce qui concerne l'échantillonnage et l'analyse de la contamination microplastique *in situ* comme par exemple :

- **Évaluer la contamination microplastique dans les sédiments des lagons perlicoles.** Celle-ci reste encore inconnue. Pourtant, les taux de filtration important de l'huître perlière couplés aux densités d'élevage (*i.e.* jusqu'à 12 000 huîtres.ha^{-1}) pourraient conduire *via* les mécanismes de biodéposition (Cole *et al.*, 2016) à une concentration massive des MP dans les sédiments (notamment sous les filières). Cette accumulation de MP pourrait entraîner un dérèglement des assemblages écologiques impactant les communautés benthiques et donc la productivité de l'écosystème lagonaire (*e.g.* flux de nutriments et du carbone). Par conséquent, dans l'objectif d'avoir une estimation exhaustive et un bilan complet de la contamination microplastique au sein des lagons perlicoles, cette approche est pertinente car très peu faite dans la littérature, d'autant plus à l'échelle de zones semi-fermées comme les lagons.

- **Améliorer le protocole de digestion des échantillons d'eau de mer.** La présence de chitine provenant des cuticules de zooplancton s'est avérée être un verrrou méthodologique dans le traitement de certains échantillons de surface (Cole *et al.*, 2015b). Plusieurs solutions peuvent être envisagées pour répondre à ce problème notamment (i) la piste prometteuse développée au cours de cette thèse, visant à utiliser les propriétés chitinolytiques de certaines bactéries marines (*e.g. Vibrio spp.* et *Pseudoalteromonas spp.*) et/ou (ii) effectuer les prélèvements *in situ* de nuit, tenant compte des migrations nycthémérales du zooplancton qui quitte la surface pour aller en profondeur.

Aussi, d'autres efforts favorisant les avancées en matière de détection, de mesure et d'analyse sont requis en vue d'améliorer la qualité et la pertinence générales des études d'impact, notamment concernant les MNP < 10 µm. Il s'agit d'informations essentielles pour évaluer les risques associés aux MNP et leur incidence sur la durabilité de l'huître perlière et l'écosystème lagonaire. Des études futures pourraient se consacrer entre autres à :

- **La menace associée aux nanoplastiques.** Bien qu'il ne soit pas encore possible de mettre en œuvre des expérimentations écologiquement pertinentes en raison du verrou méthodologique qu'ils représentent pour le suivi de la contamination *in situ*, il est important d'appréhender la menace associée aux NP considérés plus impactant sur le plan tissulaire et cellulaire de par leur petite taille. Initialement, ce volet devait être abordé dans ce projet

de thèse, en se basant notamment sur l'approche développée par Al-Sid-Cheikh *et al.* (2018). En effet, une collaboration avait été initiée avec l'Agence Internationale d'Énergie Atomique (IAEA) à Monaco qui possède les installations sécurisées requises pour ce type d'approche (*i.e.* radioactive) et adaptable à notre modèle *P. margaritifera*. Cependant, ce projet n'a pas vu le jour pour des raisons administratives internes à l'IAEA. La mise en œuvre d'une telle expérimentation permettrait néanmoins d'aborder une technologie innovante basée sur le marquage radioactif des NP au carbone 14 (NP-^{14}C). Cette méthodologie permettrait (i) de localiser et de quantifier les NP dans les différents organes de *P. margaritifera* après une exposition de quelques heures en « single feeding » et (ii) sur une période plus longue en « multi-feeding » afin de confirmer les organes les plus concernés/impactés et leur potentiel de dépuration. La contamination pourrait être réalisée *via* des microalgues mises en contact avec les NP-^{14}C. La localisation et la quantification des NP-^{14}C seraient à réaliser par autoradiographie après fixation des tissus préparés pour des coupes histologiques au cryo-microtome. Une expérimentation menée en parallèle avec des NP non marqués permettrait également d'évaluer les réponses transcriptomiques des tissus atteints par la contamination. Tant et si bien que des NP étaient présents en nombre dans les océans, l'étude des NP et leur potentiel de translocation représentent également un enjeu sanitaire pour les populations locales, notamment celles présentes sur les îles et atolls perlicoles où le muscle adducteur (« korori ») de l'huître perlière est régulièrement consommé.

- **Étudier les effets intergénérationnels des micro- et nanoplastiques.** La modulation de la réponse des individus face au stress MNP est une piste intéressante à aborder afin de comprendre l'évolution des populations et la mise en place de mécanismes d'adaptation. En effet, l'occurrence de réponses adaptatives à des conditions de stress environnementaux rencontrés par des cohortes exposées sur plusieurs générations ($n \geq 2$) a pu être observée à travers une tolérance plus élevée des générations suivantes à ces mêmes conditions (Burton et Metcalfe, 2014). Par ailleurs, Liu *et al.* (2020) ont démontré que la récupération de *Daphnia pulex* après une exposition chronique à des NP (1 µg.L^{-1}) pouvait prendre plusieurs générations. En effet, bien que l'exposition n'ait pas affecté la survie ni la longueur corporelle de *D. pulex*, le taux de croissance et la reproduction ont été influencés à la génération F2. Les réponses moléculaires ont également indiqué que les NP pouvaient moduler la réponse des défenses antioxydantes, la synthèse de la vitellogénine, le développement et la production d'énergie dans les générations F0 et F1 avec des répercutions chez les individus F2 à travers des effets inhibiteurs sur les réponses antioxydantes (Liu *et al.*, 2020). Sussarellu *et al.* (2016) ont également démontré que l'exposition des géniteurs *C. gigas* aux micro-PS 2 et 6 µm ralentissait la croissance des ovocytes des parents exposés et des larves en résultant. Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité de reproduction de l'huître perlière exposée aux MNP par l'élevage subséquent des larves obtenues en relation avec l'exposition

ou non des parents, et idéalement sur plusieurs générations. Cette fonction doit être ciblée car majeure pour la pérennisation de l'espèce.

- **Étudier la résilience des écosystèmes récifaux, les espèces et leurs fonctions écologiques face aux différentes menaces anthropiques et climatiques.** En effet, bien que la santé des écosystèmes coralliens et lagonaires soit un élément vital à l'activité socio-économique de Polynésie française (*e.g.* tourisme, pêche, aquaculture), peu d'éléments permettent d'évaluer et de prédire l'évolution de l'écosytème lagonaire soumis aux différents facteurs de stress. Ce constat est d'autant plus inquiétant du fait que les espèces tropicales (i) ont des capacités plus restreintes d'acclimatation aux variations climatiques et (ii) qu'un certain nombre d'entre elles vivent d'ores et déjà proche de leur limite maximale de température (Seebacher *et al.*, 2015). Une approche de type mésocosme permettrait d'aborder avec pertinence à la fois les interactions entre les espèces indicatrices assurant des fonctions écologiques mais également la synergie des multiples facteurs de stress (*i.e.* contamination MNP, réchauffement climatique, acidification des océans) auxquelles elles sont exposées, offrant ainsi la possibilité d'étudier et de prédire la dynamique et la résilience des populations.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abayomi, O.A., Range, P., Al-Ghouti, M.A., Obbard, J.P., Almeer, S.H., Ben-Hamadou, R., 2017. Microplastics in coastal environments of the Arabian Gulf. Mar. Pollut. Bull. 124, 181–188. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.011

Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., Hassanaghaei, M., 2018. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. Chemosphere 205, 80–87. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.076

Agilent, 2015. Mx3000P and Mx3005P qPCR systems: setup and user's guide [WWW Document]. URL www.agilent.com/genomics (accessed 5.2.19).

Akcora, P., Liu, H., Kumar, S.K., Moll, J., Li, Y., Benicewicz, B.C., Schadler, L.S., Acehan, D., Panagiotopoulos, A.Z., Pryamitsyn, V., Ganesan, V., Ilavsky, J., Thiyagarajan, P., Colby, R.H., Douglas, J.F., 2009. Anisotropic self-assembly of spherical polymer-grafted nanoparticles. Nat. Mater. 8, 354–359. https://doi.org/10.1038/nmat2404

Akhbarizadeh, R., Moore, F., Keshavarzi, B., 2018. Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in fish muscles from northeast of Persian Gulf. Environ. Pollut. 232, 154–163. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.028

Albentosa, M., Viñas, L., Besada, V., Franco, A., González-Quijano, A., 2012. First measurements of the scope for growth (SFG) in mussels from a large-scale survey in the North-Atlantic Spanish coast. Sci. Total Environ. 435–436, 430–445. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.025

Alcock, R.E., Halsall, C.J., Harris, C.A., Johnston, A.E., Lead, W.A., Sanders, Gordon., Jones, K.C., 1994. Contamination of Environmental Samples Prepared for PCB Analysis. Environ. Sci. Technol. 28, 1838–1842. https://doi.org/10.1021/es00060a013

Alford, R., Simpson, H.M., Duberman, J., Hill, G.C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H., Choyke, P.L., 2009. Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. Mol. Imaging 8, 7290.2009.00031. https://doi.org/10.2310/7290.2009.00031

Aliabad, M.K., Nassiri, M., Kor, K., 2019. Microplastics in the surface seawaters of Chabahar Bay, Gulf of Oman (Makran Coasts). Mar. Pollut. Bull. 143, 125–133. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.037

Al-Khalaifah, H., Al-Nasser, A., 2018. Immune Response of Molluscs. Molluscs. https://doi.org/10.5772/intechopen.81778

Alm, H., Tiemann, U., Torner, H., 1996. Influence of organochlorine pesticides on development of mouse embryos *in vitro*. Reprod. Toxicol. 10, 321–326. https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00061-5

Alomar, C., Estarellas, F., Deudero, S., 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. Mar. Environ. Res. 115, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.01.005

Al-Sid-Cheikh, M., Rowland, S.J., Stevenson, K., Rouleau, C., Henry, T.B., Thompson, R.C., 2018. Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. Environ. Sci. Technol. 52, 14480–14486. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05266

Álvarez-Hernández, C., Cairós, C., López-Darias, J., Mazzetti, E., Hernández-Sánchez, C., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., 2019. Microplastic debris in beaches of Tenerife (Canary Islands, Spain). Mar. Pollut. Bull. 146, 26–32. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.064

Anastasopoulou, A., Mytilineou, C., Smith, C.J., Papadopoulou, K.N., 2013. Plastic debris ingested by deep-water fish of the Ionian Sea (Eastern Mediterranean). Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap. 74, 11–13. https://doi.org/10.1016/j.dsr.2012.12.008

Anbumani, S., Kakkar, P., 2018. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 14373–14396. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1999-x

Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31, 166–169. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638

Andrady, A.L., 2017. The plastic in microplastics: A review. Mar. Pollut. Bull. 119, 12–22. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082

Andrady, A.L., 2015. Persistence of Plastic Litter in the Oceans, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–72. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_3

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596–1605. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030

Andréfouët, S., Charpy, L., Lo-Yat, A., Lo, C., 2012. Recent research for pearl oyster aquaculture management in French Polynesia. Mar. Pollut. Bull. 65, 407–414. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.021

Andréfouët, S., Muller-Karger, F.E., Robinson, J.A., Torres-Pulliza, D., Spraggins, S.A., Murch, B., 2006. Global assessment of modern coral reef extent and diversity for regional science and management applications: a view from space 14.

Andréfouët, S., Thomas, Y., Dumas, F., Lo, C., 2016. Revisiting wild stocks of black lip oyster *Pinctada margaritifera* in the Tuamotu Archipelago: The case of Ahe and Takaroa atolls and implications for the cultured pearl industry. Estuar. Coast. Shelf Sci., SI: Sustainable pearl-culture 182, 243–253. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.06.013

Andréfouët, S., Thomas, Y., Lo, C., 2014. Amount and type of derelict gear from the declining black pearl oyster aquaculture in Ahe atoll lagoon, French Polynesia. Mar. Pollut. Bull. 83, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.048

Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environ. Toxicol. Chem. 29, 730–741. https://doi.org/10.1002/etc.34

Araújo, R.F.F. de, Martins, D.B.G., Borba, M.A.C.S.M., 2016. Oxidative Stress and Disease, in: Morales-Gonzalez, J.A., Morales-Gonzalez, A., Madrigal-Santillan, E.O. (Eds.), A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2. InTech. https://doi.org/10.5772/65366

Arthur, C., Baker, J.E., 1959-, Bamford, H.A., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA. NOAA technical memorandum NOS-OR&R 30.

Asai, M., Cacciuto, A., Kumar, S.K., 2015. Quantitative analogy between polymer-grafted nanoparticles and patchy particles. Soft Matter 11, 793–797. https://doi.org/10.1039/C4SM02295E

Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 60, 2050–2055. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.014

ASTM E724-98(2012), 2012. Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs, ASTM International, West Conshokocken, PA. www.astm.org.

Aucher, J., 2009. Etude comparative du comportement composites à matrice thermoplastique ou thermodurcissable (Thèse de doctorat). Rouen.

Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. Environ. Int. 102, 165–176. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015a. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environ. Pollut. 198, 211–222. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021

Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F., 2017. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. Mar. Environ. Res. 128, 2–11. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.012

Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F., 2015b. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. Mar. Environ. Res., Particles in the Oceans: Implication for a safe marine environment 111, 18–26. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014

B

Backhaus, T., Wagner, M., 2020. Microplastics in the Environment: Much Ado about Nothing? A Debate. Glob. Chall. 4, 1900022. https://doi.org/10.1002/gch2.201900022

Bakir, A., O'Connor, I.A., Rowland, S.J., Hendriks, A.J., Thompson, R.C., 2016. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. Environ. Pollut. 219, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.046

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014a. Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. Estuar. Coast. Shelf Sci. 140, 14–21. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.01.004

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014b. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. Environ. Pollut. 185, 16–23. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.007

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2012. Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 64, 2782–2789. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.010

Balakrishnan, G., Déniel, M., Nicolai, T., Chassenieux, C., Lagarde, F., 2019. Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. Environ. Sci. Nano 6, 315–324. https://doi.org/10.1039/C8EN01005F

Balbi, T., Camisassi, G., Montagna, M., Fabbri, R., Franzellitti, S., Carbone, C., Dawson, K., Canesi, L., 2017. Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH2) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation. Chemosphere 186, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.120

Ballent, A., Corcoran, P.L., Madden, O., Helm, P.A., Longstaffe, F.J., 2016. Sources and sinks of microplastics in Canadian Lake Ontario nearshore, tributary and beach sediments. Mar. Pollut. Bull. 110, 383–395. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.037

Bandow, N., Will, V., Wachtendorf, V., Simon, F.-G., 2017. Contaminant release from aged microplastic. Environ. Chem. 14, 394. https://doi.org/10.1071/EN17064

Banni, M., Sforzini, S., Arlt, V.M., Barranger, A., Dallas, L.J., Oliveri, C., Aminot, Y., Pacchioni, B., Millino, C., Lanfranchi, G., Readman, J.W., Moore, M.N., Viarengo, A., Jha, A.N., 2017. Assessing the impact of

Benzo[a]pyrene on Marine Mussels: Application of a novel targeted low-density microarray complementing classical biomarker responses. PLOS ONE 12, e0178460. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178460

Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., Silliman, B.R., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. Ecol. Monogr. 81, 169–193. https://doi.org/10.1890/10-1510.1

Barboza, L.G.A., Gimenez, B.C.G., 2015. Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. Mar. Pollut. Bull. 97, 5–12. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.008

Barletta, M., Lima, A.R.A., Costa, M.F., 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. Sci. Total Environ. 651, 1199–1218. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.276

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 Biol. Sci. 364, 1985–1998. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205

Barrows, A.P.W., Neumann, C.A., Berger, M.L., Shaw, S.D., 2017. Grab vs. neuston tow net: a microplastic sampling performance comparison and possible advances in the field. Anal. Methods 9, 1446–1453. https://doi.org/10.1039/C6AY02387H

Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelníckova, L., Bartos, M., di Tocco, F.C., Faggio, C., 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. Neuro Endocrinol. Lett. 34 Suppl 2, 102–108.

Bayne, B., Newell, R., 1983. 9 – Physiological Energetics of Marine Molluscs. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7

Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., 1987. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 111, 1–22. https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90017-7

Bejgarn, S., MacLeod, M., Bogdal, C., Breitholtz, M., 2015. Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. Chemosphere 132, 114–119. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.010

Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., Martínez-Gómez, C., 2016. Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. Mar. Pollut. Bull. 109, 55–60. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.026

Bergmann, M., Wirzberger, V., Krumpen, T., Lorenz, C., Primpke, S., Tekman, M.B., Gerdts, G., 2017. High Quantities of Microplastic in Arctic Deep-Sea Sediments from the HAUSGARTEN Observatory. Environ. Sci. Technol. 51, 11000–11010. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03331

Bernagout, S., Bouisset, P., Leclerc, G., Rua, J., Nohl, M., Garen, P., Levy, P., Tetaura, N.-L., Poroi, D., Sham Koua, M., Liao, V., Bosserelle, P., Planes, S., Espiau, B., 2014. Réseau de surveillance des polluants anthropiques dans les lagons de Polynésie française. Rapport final - Septembre 2014. Contrat de projet Etat-Pays.

Bessa, F., Barría, P., Neto, J.M., Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P., Marques, J.C., 2018. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. Mar. Pollut. Bull. 128, 575–584. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.044

Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. Environ. Pollut. 220, 540–548. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001

Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., Koelmans, A.A., 2014. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. Environ. Sci. Technol. 48, 12336–12343. https://doi.org/10.1021/es503001d

Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). Environ. Sci. Technol. 47, 593–600. https://doi.org/10.1021/es302763x

Bijker, W.E. (Ed.), 1987. The social construction of bakelite: Toward a theory of invention. In The Social construction of technological systems: new directions in the sociology and history of technology. MIT Press, Cambridge, Mass.

Birnstiel, S., Soares-Gomes, A., da Gama, B.A.P., 2019. Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels. Mar. Pollut. Bull. 140, 241–247. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.044

Bittner, G.D., Denison, M.S., Yang, C.Z., Stoner, M.A., He, G., 2014. Chemicals having estrogenic activity can be released from some bisphenol A-free, hard and clear, thermoplastic resins. Environ. Health Glob. Access Sci. Source 13, 103. https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-103

Blarer, P., Burkhardt-Holm, P., 2016. Microplastics affect assimilation efficiency in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 23522–23532. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7584-2

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007

Bolgar, M., Hubball, J., Groeger, J., Meronek, S., 2015. Handbook for the Chemical Analysis of Plastic and Polymer Additives, in: Handbook for the Chemical Analysis of Plastic and Polymer Additives. CRC Press, Boca Raton, p. 654.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Borrelle, S.B., Ringma, J., Law, K.L., Monnahan, C.C., Lebreton, L., McGivern, A., Murphy, E., Jambeck, J., Leonard, G.H., Hilleary, M.A., Eriksen, M., Possingham, H.P., Frond, H.D., Gerber, L.R., Polidoro, B., Tahir, A., Bernard, M., Mallos, N., Barnes, M., Rochman, C.M., 2020. Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. Science 369, 1515–1518. https://doi.org/10.1126/science.aba3656

Boucher, J., Friot, D., 2017. Primary microplastics in the oceans.

Braid, H.E., Deeds, J., DeGrasse, S.L., Wilson, J.J., Osborne, J., Hanner, R.H., 2012. Preying on commercial fisheries and accumulating paralytic shellfish toxins: a dietary analysis of invasive *Dosidicus gigas* (Cephalopoda Ommastrephidae) stranded in Pacific Canada. Mar. Biol. 159, 25–31. https://doi.org/10.1007/s00227-011-1786-4

Bråte, I.L.N., Blázquez, M., Brooks, S.J., Thomas, K.V., 2018. Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels *(M. galloprovincialis*). Sci. Total Environ. 626, 1310–1318. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.141

Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. Estuar. Coast. Shelf Sci. 178, 189–195. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003

Brooks, A.L., Wang, S., Jambeck, J.R., 2018. The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. Sci. Adv. 4, eaat0131. https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0131

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of Microplastic on Shorelines Woldwide: Sources and Sinks. Environ. Sci. Technol. 45, 9175–9179. https://doi.org/10.1021/es201811s

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). Environ. Sci. Technol. 42, 5026–5031. https://doi.org/10.1021/es800249a

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris along Estuarine shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409. https://doi.org/10.1021/es903784e

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. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.012

Buestel, D., Pouvreau, S., 2000. La matière particulaire des eaux du lagon de Takapoto : nourriture potentielle pour les élevages d'huîtres perlières. Oceanol. Acta 23, 193–210. https://doi.org/10.1016/S0399-1784(00)00111-0

Burton, T., Metcalfe, N.B., 2014. Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 281, 20140311. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0311

C

Calabrese, E.J., 2002. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. Mutat. Res. 511, 181–189. https://doi.org/10.1016/s1383-5742(02)00013-3

Calder, D., Choong, H., Carlton, J., Chapman, J., Miller, J., Geller, J., 2014. Hydroids (Cnidaria: Hydrozoa) from Japanese tsunami marine debris washing ashore in the northwestern United States. Aquat. Invasions 9, 425–440. https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.4.02

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Cannas, S., Fastelli, P., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the coasts of south Tuscany (Tyrrhenian Sea). Mar. Pollut. Bull. 119, 372–375. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.008

Capolupo, M., Franzellitti, S., Valbonesi, P., Lanzas, C.S., Fabbri, E., 2018. Uptake and transcriptional effects of polystyrene microplastics in larval stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Pollut. 241, 1038–1047. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.035

Carney Almroth, B., Eggert, H., 2019. Marine Plastic Pollution: Sources, Impacts, and Policy Issues. Rev. Environ. Econ. Policy 13, 317–326. https://doi.org/10.1093/reep/rez012

Caron, A.G.M., Thomas, C.R., Berry, K.L.E., Motti, C.A., Ariel, E., Brodie, J.E., 2018. Ingestion of microplastic debris by green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Great Barrier Reef: Validation of a sequential extraction protocol. Mar. Pollut. Bull. 127, 743–751. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.062

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. Science 178, 749–750. https://doi.org/10.1126/science.178.4062.749

Castillo, A.B., Al-Maslamani, I., Obbard, J.P., 2016. Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. Mar. Pollut. Bull. 111, 260–267. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.108

Catarino, A.I., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T.B., 2017. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. Environ. Toxicol. Chem. 36, 947–951. https://doi.org/10.1002/etc.3608

CEN, 2002. Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 4: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 mm (without or with size reduction), BS EN 12457-4:2002, The European Committee for Standardization (CEN), Brussels, Belgium.

Chainy, G.B.N., Paital, B., Dandapat, J., 2016. An Overview of Seasonal Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and Vertebrate Species. Scientifica 2016, 1–8. https://doi.org/10.1155/2016/6126570

Chávez-Villalba, J., Soyez, C., Aurentz, H., Le Moullac, G., 2013. Physiological responses of female and male black-lip pearl oysters *(Pinctada margaritifera)* to different temperatures and concentrations of food. Aquat. Living Resour. 26, 263–271. https://doi.org/10.1051/alr/2013059

Chávez-Villalba, J., Soyez, C., Huvet, A., Gueguen, Y., Lo, C., Moullac, G.L., 2011. Determination of Gender in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. J. Shellfish Res. 30, 231–240. https://doi.org/10.2983/035.030.0206

Chen, M., Jin, M., Tao, P., Wang, Z., Xie, W., Yu, X., Wang, K., 2018. Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. Environ. Pollut. 242, 1146–1156. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.133

Cheung, P.K., Fok, L., Hung, P.L., Cheung, L.T.O., 2018. Spatio-temporal comparison of neustonic microplastic density in Hong Kong waters under the influence of the Pearl River Estuary. Sci. Total Environ. 628–629, 731–739. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.338

Cho, E.C., Xie, J., Wurm, P.A., Xia, Y., 2009. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. Nano Lett. 9, 1080–1084. https://doi.org/10.1021/nl803487r

Christman, G.D., Cottrell, M.T., Popp, B.N., Gier, E., Kirchman, D.L., 2011. Abundance, Diversity, and Activity of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in the Coastal Arctic Ocean in Summer and Winter. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2026–2034. https://doi.org/10.1128/AEM.01907-10

Chua, E.M., Shimeta, J., Nugegoda, 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. https://doi.org/10.1021/es405717z

Cichy, B., Kwiecien, J., Piatkowska, M., Kuzdzal, E., Gibas, E., Rymarz, G., 2010. Polyolefin oxo-degradation accelerators - a new trend to promote environmental protection. Pol. J. Chem. Technol. 12, 44–52. https://doi.org/10.2478/v10026-010-0049-3

Cincinelli, A., Scopetani, C., Chelazzi, D., Lombardini, E., Martellini, T., Katsoyiannis, A., Fossi, M.C., Corsolini, S., 2017. Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): Occurrence, distribution and characterization by FTIR. Chemosphere 175, 391–400. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.024

Claessens, M., Van Cauwenberghe, 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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.009

Clara, M., Windhofer, G., Hartl, W., Braun, K., Simon, M., Gans, O., Scheffknecht, C., Chovanec, A., 2010. Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. Chemosphere 78, 1078–1084. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.052

Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. Environ. Sci. Technol. 49, 14625–14632. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04099

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Galloway, T.S., 2015a. The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. Environ. Sci. Technol. 49, 1130–1137. https://doi.org/10.1021/es504525u

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic Ingestion by Zooplankton. Environ. Sci. Technol. 47, 6646–6655. https://doi.org/10.1021/es400663f

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025

Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., Galloway, T.S., 2016. Microplastics Alter the Properties and Sinking Rates of Zooplankton Faecal Pellets. Environ. Sci. Technol. 50, 3239–3246. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05905

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Galloway, T.S., 2015b. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. Sci. Rep. 4. https://doi.org/10.1038/srep04528

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Galloway, T.S., 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. Sci. Rep. 4. https://doi.org/10.1038/srep04528

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.011

Colton, J.B., Knapp, F.D., Burns, B.R., 1974. Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic. Science 185, 491–497.

Connors, E.J., 2017. Distribution and biological implications of plastic pollution on the fringing reef of Mo'orea, French Polynesia. PeerJ 5, e3733. https://doi.org/10.7717/peerj.3733

Connors, K.A., Dyer, S.D., Belanger, S.E., 2017. Advancing the quality of environmental microplastic research: Advancing the quality of environmental microplastic research. Environ. Toxicol. Chem. 36, 1697–1703. https://doi.org/10.1002/etc.3829

Constant, M., Kerhervé, P., Mino-Vercellio-Verollet, M., Dumontier, M., Sànchez Vidal, A., Canals, M., Heussner, S., 2019. Beached microplastics in the Northwestern Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 142, 263–273. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.032

Corcoran, P.L., Biesinger, M.C., Grifi, M., 2009. Plastics and beaches: A degrading relationship. Mar. Pollut. Bull. 58, 80–84. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.022

Cottrell, M.T., Moore, J.A., Kirchman, D.L., 1999. Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2553–2557.

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Gary, S.F., Mogg, A.O.M., Narayanaswamy, B.E., 2017. Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean. Environ. Pollut. 231, 271–280. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.026

Cózar, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernandez-Leon, S., Palma, A.T., Navarro, S., Garcia-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernandez-de-Puelles, M.L., Duarte, C.M., 2014. Plastic debris in the open ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 10239–10244. https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111

Cózar, A., Martí, E., Duarte, C.M., García-de-Lomas, J., Sebille, E. van, Ballatore, T.J., Eguíluz, V.M., González-Gordillo, J.I., Pedrotti, M.L., Echevarría, F., Troublè, R., Irigoien, X., 2017. The Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation. Sci. Adv. 3, e1600582. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600582

Crawford, C.B., Quinn, B., 2017. 8 - Microplastic collection techniques, in: Crawford, C.B., Quinn, B. (Eds.), Microplastic Pollutants. Elsevier, pp. 179–202. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809406-8.00008-6

D

Dachs, J., Méjanelle, L., 2010. Organic Pollutants in Coastal Waters, Sediments, and Biota: A Relevant Driver for Ecosystems During the Anthropocene? Estuaries Coasts 33, 1–14. https://doi.org/10.1007/s12237-009-9255-8

Dai, Z., Zhang, H., Zhou, Q., Tian, Y., Chen, T., Tu, C., Fu, C., Luo, Y., 2018. Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities. Environ. Pollut. 242, 1557–1565. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.131

Damasceno, P.F., Engel, M., Glotzer, S.C., 2012. Predictive Self-Assembly of Polyhedra into Complex Structures. Science 337, 453–457. https://doi.org/10.1126/science.1220869

Dang, H., Lovell, C.R., 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. Appl. Environ. Microbiol. 66, 467–475. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.467-475.2000

Dauphin, Y., Ball, A.D., Cotte, M., Cuif, J.-P., Meibom, A., Salomé, M., Susini, J., Williams, C.T., 2008. Structure and composition of the nacre–prisms transition in the shell of *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). Anal. Bioanal. Chem. 390, 1659–1669. https://doi.org/10.1007/s00216-008-1860-z

Davidson, K., Dudas, S.E., 2016. Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 71, 147–156. https://doi.org/10.1007/s00244-016-0286-4

de Haan, W.P., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., 2019. Floating microplastics and aggregate formation in the Western Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 140, 523–535. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.053

de 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., Massaro, 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., Large marine vertebrates as sentinels of GES in the European MSFD 100, 10–16. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.03.017

de Souza Machado, A.A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., Rillig, M.C., 2018. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. Glob. Change Biol. 24, 1405–1416. https://doi.org/10.1111/gcb.14020

de Stephanis, R., Giménez, J., Carpinelli, E., Gutierrez-Exposito, C., Cañadas, A., 2013. As main meal for sperm whales: plastics debris. Mar. Pollut. Bull. 69, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.033

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. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018

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. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.019

Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K.A., Corsi, I., 2014. Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. Environ. Sci. Technol. 48, 12302–12311. https://doi.org/10.1021/es502569w

Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44, 842–852. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5

DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5069–5072. https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.035

Détrée, C., Gallardo-Escárate, C., 2018. Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. Fish Shellfish Immunol. 83, 52–60. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A.D., 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Mar. Pollut. Bull. 98, 179–187. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.051

Di Mauro, R., Kupchik, M.J., Benfield, M.C., 2017. Abundant plankton-sized microplastic particles in shelf waters of the northern Gulf of Mexico. Environ. Pollut. 230, 798–809. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.030

Doganci, M.D., Cansoy, C.E., Ucar, I.O., Erbil, H.Y., Mielczarski, E., Mielczarski, J.A., 2012. Combined XPS and contact angle studies of flat and rough ethylene-vinyl acetate copolymer films. J. Appl. Polym. Sci. 124, 2100–2109. https://doi.org/10.1002/app.35189

Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., Choi, K.-S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 42, 91–97. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.030

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. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.001

DRMM, 2018a. Repérage et évaluation du stock de déchets perlicoles immergés dans le domaine maritime public de Ahe. Convention N°09035/MPF/DRMM.

DRMM, 2018b. Rapport de mission - Levé bathymétrique et cartographie des déchets perlicoles du lagon de Takapoto (archipel des Tuamotu). Convention N°7368/MPF/DRMM.

DRMM, 2017a. Bulletin Statistique - Synthèse des données de la pêche professionelle, de l'aquaculture et de la perliculture - Edition 2017.

DRMM, 2017b. Rapport de mission - Levé de cartographie des déchets perlicoles du lagon de Manihi (archipel des Tuamotu). Convention N°09034/MPF/DRMM.

DRMM, 2015. Rapport de repérage et d'évaluation des déchets immergés - Identification des Hoa à curer - Lagon de Takaroa.

Du, J., Tang, J., Xu, S., Ge, J., Dong, Y., Li, H., Jin, M., 2018. A review on silver nanoparticles-induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP 98, 231–239. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.003

Dubaish, F., Liebezeit, G., 2013. Suspended Microplastics and Black Carbon Particles in the Jade System, Southern North Sea. Water. Air. Soil Pollut. 224, 1352. https://doi.org/10.1007/s11270-012-1352-9

Duemichen, E., Braun, U., Senz, R., Fabian, G., Sturm, H., 2014. Assessment of a new method for the analysis of decomposition gases of polymers by a combining thermogravimetric solid-phase extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1354, 117–128. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.057

Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environ. Sci. Eur. 28, 2. https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y

Dupuy, C., Vaquer, A., Lam Hoai, T., Rougier, C., Mazouni, N., Lautier, J., Collos, Y., Le Gall, S., 2000. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. Mar. Ecol. Prog. Ser. 205, 171–184.

Dyachenko, A., Mitchell, J., Arsem, N., 2017. Extraction and identification of microplastic particles from secondary wastewater treatment plant (WWTP) effluent. Anal. Methods 9, 1412–1418. https://doi.org/10.1039/C6AY02397E

E

Edo, C., Tamayo-Belda, M., Martínez-Campos, S., Martín-Betancor, K., González-Pleiter, M., Pulido-Reyes, G., García-Ruiz, C., Zapata, F., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R., 2019. Occurrence and identification of microplastics along a beach in the Biosphere Reserve of Lanzarote. Mar. Pollut. Bull. 143, 220–227. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.061

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics ≥10μm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Mar. Pollut. Bull. 100, 70–81. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.027

Engler, R.E., 2012. The Complex Interaction between Marine Debris and Toxic Chemicals in the Ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302–12315. https://doi.org/10.1021/es3027105

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. PLoS ONE 9, e111913. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913

Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., Hafner, J., Zellers, A., Rifman, S., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar. Pollut. Bull. 68, 71–76. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.12.021

Erni-Cassola, G., Gibson, M.I., Thompson, R.C., Christie-Oleza, J.A., 2017. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μm) in Environmental Samples. Environ. Sci. Technol. 51, 13641–13648. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04512

Esiukova, E., 2017. Plastic pollution on the Baltic beaches of Kaliningrad region, Russia. Mar. Pollut. Bull. 114, 1072–1080. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.001

EUROMAP, 2015. Plastics resin production and consumption in 63 countries worldwide (2009-2020).

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M., 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics 32, 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

ExpéditionMED, 2016. Déchets côtiers - Sources et origines. Rapport 2016 sur l'arc Arc Atlantique.

F

Fabres, J., Savelli, H., Schoolmeester, T., Rucevska, I., Baker, E., 2016. Marine Litter Vital Graphics.

Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. Sci. Total Environ. 636, 220–229. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264

Fankhauser-Noti, A., Grob, K., 2007. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. Anal. Chim. Acta 582, 353–360. https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.012

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 [WWW Document]. www.fao.org. https://doi.org/10.4060/CA9229EN

FAO, 2017. FAO Aquaculture Newsletter N°57. The impact of microplastics on food safety: the case of fishery and aquaculture products.

Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to Carcinus maenas (L.). Environ. Pollut. 177, 1–3. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046

Fatoki, O.S., Bornman, M., Ravandhalala, L., Chimuka, L., Genthe, B., Adeniyi, A., 2010. Phthalate ester plasticizers in freshwater systems of Venda, South Africa and potential health effects. Water SA 36. https://doi.org/10.4314/wsa.v36i1.50916

Fazey, F.M.C., Ryan, P.G., 2016. Debris size and buoyancy influence the dispersal distance of stranded litter. Mar. Pollut. Bull. 110, 371–377. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.039

Feldman, D., 2008. Polymer History. Des. Monomers Polym. 11, 1–15. https://doi.org/10.1163/156855508X292383

Fendall, L.S., Sewell, M.A., 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. Mar. Pollut. Bull. 58, 1225–1228. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025

Fernández, B., Albentosa, M., 2019. Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel. Environ. Pollut. 249, 321–329. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.037

Ferreira, P., Fonte, E., Soares, M.E., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2016. Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature. Aquat. Toxicol. 170, 89–103. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.011

Filella, M., 2015. Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: methodological and conceptual aspects. Environ. Chem. 12, 527–538. https://doi.org/10.1071/EN15012

Fischer, M., Scholz-Böttcher, B.M., 2017. Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by Pyrolysis-Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Environ. Sci. Technol. 51, 5052–5060. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06362

Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A., Quaife, M.L., 1964. Chronic oral toxicity of aldrin and dieldrin in rats and dogs. Food Cosmet. Toxicol. 2, 551–562. https://doi.org/10.1016/S0015-6264(64)80354-0

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J., Koelmans, A.A., 2013. Plastic in North Sea Fish. Environ. Sci. Technol. 47, 8818–8824. https://doi.org/10.1021/es400931b

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.013

Fougerouse-Tsing, A., Herbaut, C., 1994. Atlas anatomique de l'huitre perlière : *Pinctada margaritifera*. Etablissement pour la Valorisation des Activités Aquacoles et Maritimes.

Fournier, J., Levesque, E., Pouvreau, S., Pennec, M.L., Moullac, G.L., 2012. Influence of plankton concentration on gametogenesis and spawning of the black lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* in Ahe atoll lagoon (Tuamotu archipelago, French polynesia). Mar. Pollut. Bull. 65, 463–470. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.03.027

Franzellitti, S., Capolupo, M., Wathsala, R.H.G.R., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2019. The Multixenobiotic resistance system as a possible protective response triggered by microplastic ingestion in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Larvae and adult stages. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 219, 50–58. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.02.005

Frère, L., Paul-Pont, I., Moreau, J., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., Rinnert, E., 2016. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. Mar. Pollut. Bull. 113, 461–468. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.051

Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., 2017. Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: A case study of the Bay of Brest (Brittany, France). Environ. Pollut. 225, 211–222. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.023

Frias, J.P.G.L., Sobral, P., Ferreira, A.M., 2010. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. Mar. Pollut. Bull. 60, 1988–1992. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.030

Friedel, R., 1979. Parkesine and Celluloid. The Failure and Success of the First Modern Plastic, History of technology. Bloomsbury Academic. https://doi.org/10.5040/9781350017603

Frydkjær, C.K., Iversen, N., Roslev, P., 2017. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 99, 655–661. https://doi.org/10.1007/s00128-017-2186-3

Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P.C., Yu, H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. J. Food Drug Anal., Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications 22, 64–75. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005

Fukushima, S., Kinoshita, A., Puatanachokchai, R., Kushida, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., 2005. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. Carcinogenesis 26, 1835–1845. https://doi.org/10.1093/carcin/bgi160

| G |

Gaertner-Mazouni, N., Lacoste, E., Bodoy, A., Peacock, L., Rodier, M., Langlade, M.-J., Orempuller, J., Charpy, L., 2012. Nutrient fluxes between water column and sediments: potential influence of the pearl oyster culture. Mar. Pollut. Bull. 65, 500–505. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.02.013

Gaertner-Mazouni, N., Rodriguez, T., 2017. Note de synhtèse relative aux intéractions Perliculture-Environnement. Rapport UPF réalisé dans le cadre du projet RESCCUE, Communauté du Pacifique CPS, 28 pages.

Gaertner-Mazouni, N., Rodriguez, T., Gaertner, J.-C., 2017. Caractérisation des macro-déchets immergés au sein du lagon des îles Gambier : bilan des connaissances et étude sur l'opportunité de leur collecte.

Gajšt, T., Bizjak, T., Palatinus, A., Liubartseva, S., Kržan, A., 2016. Sea surface microplastics in Slovenian part of the Northern Adriatic. Mar. Pollut. Bull. 113, 392–399. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.031

Galgani, F., Hanke, G., Maes, T., 2015. Global Distribution, Composition and Abundance of Marine Litter, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 29–56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_2

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., De Vrees, L., 2013. Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. ICES J. Mar. Sci. 70, 1055–1064. https://doi.org/10.1093/icesjms/fst122

Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. Mar. Pollut. Bull. 92, 170–179. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041

Galloway, T.S., Cole, M., Lewis, C., 2017. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. Nat. Ecol. Evol. 1. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116

Gandara e Silva, P.P., Nobre, C.R., Resaffe, P., Pereira, C.D.S., Gusmão, F., 2016. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. Water Res. 106, 364–370. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.016

Gardon, T., Huvet, A., Paul-Pont, I., Cassone, A.-L., Sham Koua, M., Soyez, C., Jezequel, R., Receveur, J., Le Moullac, G., 2020a. Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Water Res. 179, 115890. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115890

Gardon, T., Morvan, L., Huvet, A., Quillien, V., Soyez, C., Le Moullac, G., Le Luyer, J., 2020b. Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Environ. Pollut. 266, 115180. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115180

Gardon, T., Reisser, C., Soyez, C., Quillien, V., Le Moullac, G., 2018. Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. Environ. Sci. Technol. 52, 5277–5286. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00168

Gedde, U.W., 1999. A Brief Introduction to Polymer Science, in: Polymer Physics. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–18. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0543-9_1

Gerdol, M., Gomez-Chiarri, M., Castillo, M.G., Figueras, A., Fiorito, G., Moreira, R., Novoa, B., Pallavicini, A., Ponte, G., Roumbedakis, K., Venier, P., Vasta, G.R., 2018. Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a Focus on Bivalvia, in: Cooper, E.L. (Ed.), Advances in Comparative Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 225–341. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_11

Gerritse, J., Leslie, H.A., de Tender, C.A., Devriese, L.I., Vethaak, A.D., 2020. Fragmentation of plastic objects in a laboratory seawater microcosm. Sci. Rep. 10, 10945. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67927-1

Gervis, M.H., Sims, N.A., 1992. The Biology and Culture of Pearl Oysters (Bivalvia Pteriidae). WorldFish.

GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment". Reports Stud. GESAMP 90, 96. doi:10.13140/RG.2.1.3803.7925.

Gewert, B., Plassmann, M.M., MacLeod, M., 2015. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. Environ. Sci. Process. Impacts 17, 1513–1521. https://doi.org/10.1039/C5EM00207A

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci. Adv. 3, e1700782. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782

Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018. Current opinion: What is a nanoplastic? Environ. Pollut. 235, 1030–1034. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024

Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Halle, A.T., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. Environ. Sci. Nano 3, 346–350. https://doi.org/10.1039/C6EN00008H

Gilardi, K.V.K., Carlson-Bremer, D., June, J.A., Antonelis, K., Broadhurst, G., Cowan, T., 2010. Marine species mortality in derelict fishing nets in Puget Sound, WA and the cost/benefits of derelict net removal. Mar. Pollut. Bull. 60, 376–382. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.10.016

Gilbert, M., 2017. Plastics Materials, in: Brydson's Plastics Materials. Elsevier, pp. 1–18. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00001-3

Gnaiger, E., 1983. Calculation of Energetic and Biochemical Equivalents of Respiratory Oxygen Consumption, in: Gnaiger, Erich, Forstner, H. (Eds.), Polarographic Oxygen Sensors. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 337–345. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81863-9_30

Goldstein, M.C., Goodwin, D.S., 2013. Gooseneck barnacles (Lepas spp.) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. PeerJ 1, e184. https://doi.org/10.7717/peerj.184

Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. Biol. Lett. 8, 817–820. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0298

Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol.

In Vitro, Twelfth International Workshop on In vitro Toxicology 17, 539–546. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00093-6
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. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.09.007
Green, D.S., 2016. Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. Environ. Pollut. 216, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.043
Green, D.S., Boots, B., Blockley, D.J., Rocha, C., Thompson, R., 2015. Impacts of Discarded Plastic Bags on Marine Assemblages and Ecosystem Functioning. Environ. Sci. Technol. 49, 5380–5389. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00277
Green, D.S., Boots, B., O'Connor, N.E., Thompson, R., 2017. Microplastics Affect the Ecological Functioning of an Important Biogenic Habitat. Environ. Sci. Technol. 51, 68–77. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04496
Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C., Carolan, J.C., 2019. Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*). Environ. Pollut. 246, 423–434. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.017
Green, T.J., Raftos, D., Speck, P., Montagnani, C., 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. J. Gen. Virol. 96, 2471–2482. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244
Gregson, N., Crang, M., 2019. Made in China and the new world of secondary resource recovery. Environ. Plan. Econ. Space 51, 1031–1040. https://doi.org/10.1177/0308518X18791175
Gricourt, L., Mathieu, M., Kellner, K., 2006. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of an homologous insulin receptor-related receptor. Aquaculture 251, 85–98. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.015
Grigore, M., 2017. Methods of Recycling, Properties and Applications of Recycled Thermoplastic Polymers. Recycling 2, 24. https://doi.org/10.3390/recycling2040024
Guderley, H., Pörtner, H.O., 2010. Metabolic power budgeting and adaptive strategies in zoology: examples from scallops and fishThe present review is one of a series of occasional review articles that have been invited by the Editors and will feature the broad range of disciplines and expertise represented in our Editorial Advisory Board. Can. J. Zool. 88, 753–763. https://doi.org/10.1139/Z10-039
Gueguen, Y., Czorlich, Y., Mastail, M., Le Tohic, B., Defay, D., Lyonnard, P., Marigliano, D., Gauthier, J.-P., Bari, H., Lo, C., Chabrier, S., Le Moullac, G., 2015. Yes, it turns: experimental evidence of pearl rotation during its formation. R. Soc. Open Sci. 2, 150144. https://doi.org/10.1098/rsos.150144
Gueguen, Y., Gaertner-Mazouni, N., Lo, C., Le Moullac, G., 2016. Integrated management of pearl culture in French Polynesia in the context of global change: Synopsis of existing results. Estuar. Coast. Shelf Sci. 182, 229–234. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.07.010
Gustafson, H.H., Holt-Casper, D., Grainger, D.W., Ghandehari, H., 2015. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. Nano Today 10, 487–510. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006
Güven, O., Gökdağ, K., Jovanović, B., Kıdeyş, A.E., 2017. Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. Environ. Pollut. 223, 286–294. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.025

H

Haider, T.P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., Wurm, F.R., 2019. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. Angew. Chem. Int. Ed. 58, 50–62. https://doi.org/10.1002/anie.201805766
Hall, N.M., Berry, K.L.E., Rintoul, L., Hoogenboom, M.O., 2015. Microplastic ingestion by scleractinian corals. Mar. Biol. 162, 725–732. https://doi.org/10.1007/s00227-015-2619-7
Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R., 2008. A global map of human impact on marine ecosystems. Science 319, 948–952. https://doi.org/10.1126/science.1151084
Harrison, J.P., Ojeda, J.J., Romero-González, M.E., 2012. The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. Sci. Total Environ. 416, 455–463. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.078
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. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0232-4
Hart, M.W., 1991. Particle Captures and the Method of Suspension Feeding by Echinoderm Larvae. Biol. Bull. 180, 12–27. https://doi.org/10.2307/1542425
Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M., 2019. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. Environ. Sci. Technol. 53, 1039–1047. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297
Hartmann, N.B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L.H., Schmidt, S.N., Mayer, P., Meibom, A., Baun, A., 2017. Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota. Integr. Environ. Assess. Manag. 13, 488–493. https://doi.org/10.1002/ieam.1904

Hawkins, A., James, M., Hickman, R., Hatton, S., Weatherhead, M., 1999. Modelling of suspension-feeding and growth in the green-lipped mussel *Perna canaliculus* exposed to natural and experimental variations of seston availability in the Marlborough Sounds, New Zealand. Mar. Ecol. Prog. Ser. 191, 217–232. https://doi.org/10.3354/meps191217

Hebner, T.S., Maurer-Jones, M.A., 2020. Characterizing microplastic size and morphology of photodegraded polymers placed in simulated moving water conditions. Environ. Sci. Process. Impacts 22, 398–407. https://doi.org/10.1039/C9EM00475K

Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. Chemosphere 182, 781–793. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.096

Hermabessiere, L., Paul-Pont, I., Cassone, A.-L., Himber, C., Receveur, J., Jezequel, R., El Rakwe, M., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Huvet, A., Dehaut, A., Duflos, G., Soudant, P., 2019. Microplastic contamination and pollutant levels in mussels and cockles collected along the channel coasts. Environ. Pollut. 250, 807–819. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.051

Hermsen, E., Mintenig, S.M., Besseling, E., Koelmans, A.A., 2018. Quality Criteria for the Analysis of Microplastic in Biota Samples: A Critical Review. Environ. Sci. Technol. 52, 10230–10240. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01611

Herrera, A., Asensio, M., Martínez, I., Santana, A., Packard, T., Gómez, M., 2018. Microplastic and tar pollution on three Canary Islands beaches: An annual study. Mar. Pollut. Bull. 129, 494–502. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.020

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075. https://doi.org/10.1021/es2031505

Hildebrandt, L., Voigt, N., Zimmermann, T., Reese, A., Proefrock, D., 2019. Evaluation of continuous flow centrifugation as an alternative technique to sample microplastic from water bodies. Mar. Environ. Res. 151, 104768. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104768

Hinojosa, I.A., Thiel, M., 2009. Floating marine debris in fjords, gulfs and channels of southern Chile. Mar. Pollut. Bull. 58, 341–350. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.10.020

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press.

Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 160, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2115–2126. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311

Hõrak, P., Cohen, A., 2010. How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues. Funct. Ecol. 24, 960–970. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01755.x

Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. Sci. Total Environ. 586, 127–141. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190

Hu, L., Su, L., Xue, Y., Mu, J., Zhu, J., Xu, J., Shi, H., 2016. Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. Chemosphere 164, 611–617. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.002

Hüffer, T., Praetorius, A., Wagner, S., von der Kammer, F., Hofmann, T., 2017. Microplastic Exposure Assessment in Aquatic Environments: Learning from Similarities and Differences to Engineered Nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 51, 2499–2507. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04054

Hui, B., Vonau, V., Moriceau, J., Tetumu, R., Vanaa, V., Demoy-Schneider, M., Suquet, M., Le Moullac, G., 2011. Hatchery-scale trials using cryopreserved spermatozoa of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. Aquat. Living Resour. 24, 219–223. https://doi.org/10.1051/alr/2011117

Hurley, R.R., Lusher, A.L., Olsen, M., Nizzetto, L., 2018. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. Environ. Sci. Technol. 52, 7409–7417. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01517

Huvet, A., Paul-Pont, I., Fabioux, C., Lambert, C., Suquet, M., Thomas, Y., Robbens, J., Soudant, P., Sussarellu, R., 2016. Reply to Lenz *et al.*: Quantifying the smallest microplastics is the challenge for a comprehensive view of their environmental impacts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, E4123-4124. https://doi.org/10.1073/pnas.1607221113

Hyvärinen, A., Oja, E., 2000. Independent component analysis: algorithms and applications. Neural Netw. 13, 411–430. https://doi.org/10.1016/S0893-6080(00)00026-5

I

IEOM, 2015. Polynésie française - Rapport annuel 2014.

Imhof, H.K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N.P., Laforsch, C., 2012. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. Limnol. Oceanogr. Methods 10, 524–537. https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.524

Imhof, H.K., Sigl, R., Brauer, E., Feyl, S., Giesemann, P., Klink, S., Leupolz, K., Löder, M.G.J., Löschel, L.A., Missun, J., Muszynski, S., Ramsperger, A.F.R.M., Schrank, I., Speck, S., Steibl, S., Trotter, B., Winter, I., Laforsch,

C., 2017. Spatial and temporal variation of macro-, meso- and microplastic abundance on a remote coral island of the Maldives, Indian Ocean. Mar. Pollut. Bull. 116, 340–347. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.010

Imran, Md., Das, K.R., Naik, M.M., 2019. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. Chemosphere 215, 846–857. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114

Ioakeimidis, C., Zeri, C., Kaberi, H., Galatchi, M., Antoniadis, K., Streftaris, N., Galgani, F., Papathanassiou, E., Papatheodorou, G., 2014. A comparative study of marine litter on the seafloor of coastal areas in the Eastern Mediterranean and Black Seas. Mar. Pollut. Bull. 89, 296–304. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.044

Isaksson, C., 2010. Pollution and Its Impact on Wild Animals: A Meta-Analysis on Oxidative Stress. EcoHealth 7, 342–350. https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7

Isobe, A., Uchida, K., Tokai, T., Iwasaki, S., 2015. East Asian seas: A hot spot of pelagic microplastics. Mar. Pollut. Bull. 101, 618–623. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.042

Isobe, A., Uchiyama-Matsumoto, K., Uchida, K., Tokai, T., 2017. Microplastics in the Southern Ocean. Mar. Pollut. Bull. 114, 623–626. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.037

ISPF, 2015. Points forts de la Polynésie française. Bilan : la perle en 2015.

Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. Environ. Pollut. 185, 352–364. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.040

J

Jackson, G.D., Buxton, N.G., George, M.J.A., 2000. Diet of the southern opah Lampris immaculatus on the Patagonian Shelf; the significance of the squid Moroteuthis ingens and anthropogenic plastic. Mar. Ecol. Prog. Ser. 206, 261–271. https://doi.org/10.3354/meps206261

Jakovcevic, A., Steg, L., Mazzeo, N., Caballero, R., Franco, P., Putrino, N., Favara, J., 2014. Charges for plastic bags: Motivational and behavioral effects. J. Environ. Psychol. 40, 372–380. https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2014.09.004

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771. https://doi.org/10.1126/science.1260352

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.024

Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Kržan, A., 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 219, 201–209. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037

Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., Souissi, S., Lee, S.-J., Shin, K.-H., Park, H.G., Lee, J.-S., 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod Paracyclopina nana. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/srep41323

Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, Y.H., Kim, M.-S., Lee, Jin-Sol, Seo, J.S., Wang, M., Lee, Jae-Seong, 2018. Nanoplastic Ingestion Enhances Toxicity of Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Monogonont Rotifer Brachionus koreanus *via* Multixenobiotic Resistance (MXR) Disruption. Environ. Sci. Technol. 52, 11411–11418. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03211

Jeong, C.-B., Won, E.-J., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Hwang, D.-S., Hwang, U.-K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.-J., Lee, J.-S., 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). Environ. Sci. Technol. 50, 8849–8857. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01441

Jin, X., Yue, S., Wells, K.S., Singer, V.L., 1994. SYBR green-TM-1 A new fluorescent dye optimized for detection of picogram amounts of DNA in gels [WWW Document]. Biophys. J. 662 Part. URL https://eurekamag.com/research/033/287/033287520.php (accessed 12.3.19).

Jouaux, A., Blin, J.L., Adeline, B., Heude-Berthelin, C., Sourdaine, P., Mathieu, M., Kellner, K., 2013. Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* — Involvement of insulin signaling. Aquaculture 388–391, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.009

Joubert, C., Linard, C., Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Teaniniuraitemoana, V., Ky, C.L., Gueguen, Y., 2014. Temperature and Food Influence Shell Growth and Mantle Gene Expression of Shell Matrix Proteins in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. PLoS ONE 9, e103944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103944

Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cléon, I., Cochennec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C., 2010. Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. BMC Genomics 11, 613. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-613

| K |

Kalogerakis, N., Karkanorachaki, K., Kalogerakis, G.C., Triantafyllidi, E.I., Gotsis, A.D., Partsinevelos, P., Fava, F., 2017. Microplastics Generation: Onset of Fragmentation of Polyethylene Films in Marine Environment Mesocosms. Front. Mar. Sci. 4. https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00084

Kang, J.-H., Kwon, O.Y., Lee, K.-W., Song, Y.K., Shim, W.J., 2015. Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. Mar. Pollut. Bull. 96, 304–312. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.054

Kanhai, L.D.K., Gårdfeldt, K., Lyashevska, O., Hassellöv, M., Thompson, R.C., O'Connor, I., 2018. Microplastics in sub-surface waters of the Arctic Central Basin. Mar. Pollut. Bull. 130, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.011

Kanhai, L.D.K., Officer, R., Lyashevska, O., Thompson, R.C., O'Connor, I., 2017. Microplastic abundance, distribution and composition along a latitudinal gradient in the Atlantic Ocean. Mar. Pollut. Bull. 115, 307–314. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.025

Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.-J., Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? Anal. Bioanal. Chem. 408, 8377–8391. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9956-3

Karami, A., 2017. Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics. Chemosphere 184, 841–848. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.048

Karapanagioti, H.K., Klontza, I., 2008. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesvos island beaches (Greece). Mar. Environ. Res. 65, 283–290. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.11.005

Karin, O., Swisa, A., Glaser, B., Dor, Y., Alon, U., 2016. Dynamical compensation in physiological circuits. Mol. Syst. Biol. 12. https://doi.org/10.15252/msb.20167216

Kay, V.R., Chambers, C., Foster, W.G., 2013. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. Crit. Rev. Toxicol. 43, 200–219. https://doi.org/10.3109/10408444.2013.766149

Kedzierski, M., 2017. Pollutions du milieu littoral par les microplastiques : Méthodes d'évaluation (Thèse de doctorat). Lorient.

Kedzierski, M., D'Almeida, M., Magueresse, A., Le Grand, A., Duval, H., César, G., Sire, O., Bruzaud, S., Le Tilly, V., 2018. Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. Mar. Pollut. Bull. 127, 684–694. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.059

Kedzierski, M., Villain, J., Falcou-Préfol, M., Kerros, M.E., Henry, M., Pedrotti, M.L., Bruzaud, S., 2019. Microplastics in Mediterranean Sea: A protocol to robustly assess contamination characteristics. PLOS ONE 14, e0212088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212088

Keswani, A., Oliver, D.M., Gutierrez, T., Quilliam, R.S., 2016. Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. Mar. Environ. Res. 118, 10–19. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.04.006

Khan, F.R., Syberg, K., Shashoua, Y., Bury, N.R., 2015. Influence of polyethylene microplastic beads on the uptake and localization of silver in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Pollut. 206, 73–79. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.06.009

Kiessling, T., Gutow, L., Thiel, M., 2015. Marine Litter as Habitat and Dispersal Vector, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 141–181. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_6

Kim, I.-S., Chae, D.-H., Kim, S.-K., Choi, S., Woo, S.-B., 2015. Factors Influencing the Spatial Variation of Microplastics on High-Tidal Coastal Beaches in Korea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 299–309. https://doi.org/10.1007/s00244-015-0155-6

Kirstein, I.V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., Gerdts, G., 2016. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic Vibrio spp. on microplastic particles. Mar. Environ. Res. 120, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.07.004

Klein, S., Worch, E., Knepper, T.P., 2015. Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. Environ. Sci. Technol. 49, 6070–6076. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00492

Klopfenstein, D.V., Zhang, L., Pedersen, B.S., Ramírez, F., Warwick Vesztrocy, A., Naldi, A., Mungall, C.J., Yunes, J.M., Botvinnik, O., Weigel, M., Dampier, W., Dessimoz, C., Flick, P., Tang, H., 2018. GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. Sci. Rep. 8, 10872. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28948-z

Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. Environ. Sci. Technol. 50, 3315–3326. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069

Koelmans, A.A., Besseling, E., Foekema, E., Kooi, M., Mintenig, S., Ossendorp, B.C., Redondo-Hasselerharm, P.E., Verschoor, A., van Wezel, A.P., Scheffer, M., 2017. Risks of Plastic Debris: Unravelling Fact, Opinion, Perception, and Belief. Environ. Sci. Technol. 51, 11513–11519. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02219

Koelmans, A.A., Besseling, E., Foekema, E.M., 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. Environ. Pollut. 187, 49–54. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.013

Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 325–340. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_12

Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., 2013. Plastic as a Carrier of POPs to Aquatic Organisms: A Model Analysis. Environ. Sci. Technol. 47, 7812–7820. https://doi.org/10.1021/es401169n

Kögel, T., Bjorøy, Ø., Toto, B., Bienfait, A.M., Sanden, M., 2020. Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. Sci. Total Environ. 709, 136050. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136050

Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., Shi, H., 2018. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. Sci. Total Environ. 610–611, 635–640. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.053

Kolde, R., Kolde, M., 2015. Package Pheatmap.

Kooi, M., Nes, E.H. van, Scheffer, M., Koelmans, A.A., 2017. Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. Environ. Sci. Technol. 51, 7963–7971. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04702

Kopjar, N., Žunec, S., Mendaš, G., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković, B.T., Milić, M., Pavičić, I., Čermak, A.M.M., Pizent, A., Lucić Vrdoljak, A., Želježić, D., 2018. Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. Chem. Biol. Interact. 279, 51–63. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.029

Krishnamoorti, R., Vaia, R.A., 2007. Polymer nanocomposites. J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys. 45, 3252–3256. https://doi.org/10.1002/polb.21319

Kuchel, R.P., Raftos, D.A., Birch, D., Vella, N., 2010. Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata*. J. Invertebr. Pathol. 105, 36–48. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.011

Kühn, S., Rebolledo, E.B., Franeker, J.A. van, 2015. Deleterious effects of litter on marine life. Mar. Anthropog. Litter 75–116. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_4

Kukulka, T., Law, K.L., Proskurowski, G., 2016. Evidence for the Influence of Surface Heat Fluxes on Turbulent Mixing of Microplastic Marine Debris. J. Phys. Oceanogr. 46, 809–815. https://doi.org/10.1175/JPO-D-15-0242.1

Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét-Ferguson, S., Meyer, D.W., Law, K.L., 2012. The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. Geophys. Res. Lett. 39. https://doi.org/10.1029/2012GL051116

L

Lacerda, A.L. d F., Rodrigues, L. dos S., van Sebille, E., Rodrigues, F.L., Ribeiro, L., Secchi, E.R., Kessler, F., Proietti, M.C., 2019. Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula. Sci. Rep. 9, 3977. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40311-4

Lacoste, É., Gaertner-Mazouni, N., 2016. Nutrient regeneration in the water column and at the sediment–water interface in pearl oyster culture (*Pinctada margaritifera*) in a deep atoll lagoon (Ahe, French Polynesia). Estuar. Coast. Shelf Sci., SI: Sustainable pearl-culture 182, 304–309. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.01.037

Lacoste, É., Gueguen, Y., Moullac, G.L., Koua, M.S., Gaertner-Mazouni, N., 2014. Influence of farmed pearl oysters and associated biofouling communities on nutrient regeneration in lagoons of French Polynesia. https://doi.org/10.3354/aei00107

Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. J. Chromatogr. A 1349, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.036

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., Weismann, T., 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, Salmo trutta f. fario. Aquat. Toxicol. 75, 213–224. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.004

Laist, D.W., 1997. Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records, in: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.), Marine Debris, Springer Series on Environmental Management. Springer New York, New York, NY, pp. 99–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8486-1_10

Lal, M.M., Southgate, P.C., Jerry, D.R., Zenger, K.R., 2018. Genome-wide comparisons reveal evidence for a species complex in the black-lip pearl oyster Pinctada margaritifera (Bivalvia: Pteriidae). Sci. Rep. 8. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18602-5

Lamb, J.B., Willis, B.L., Fiorenza, E.A., Couch, C.S., Howard, R., Rader, D.N., True, J.D., Kelly, L.A., Ahmad, A., Jompa, J., Harvell, C.D., 2018. Plastic waste associated with disease on coral reefs. Science 359, 460–462. https://doi.org/10.1126/science.aar3320

Lambert, S., Scherer, C., Wagner, M., 2017. Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties: Ecotoxicity Testing of Microplastics. Integr. Environ. Assess. Manag. 13, 470–475. https://doi.org/10.1002/ieam.1901

Lambert, S., Wagner, M., 2016. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. Chemosphere 145, 265–268. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.078

Lassen, C., Hansen, S.F., Magnusson, K., Hartmann, N.B., Jensen, P.R., Nielsen, T.G., Brinch, A., 2015. Microplastics: Occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. Danish Environmental Protection Agency.

Latchere, O., Mehn, V., Gaertner-Mazouni, N., Moullac, G.L., Fievet, J., Belliard, C., Cabral, P., Saulnier, D., 2018. Influence of water temperature and food on the last stages of cultured pearl mineralization from the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. PLOS ONE 13, e0193863. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193863

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.020

Lau, W.W.Y., Shiran, Y., Bailey, R.M., Cook, E., Stuchtey, M.R., Koskella, J., Velis, C.A., Godfrey, L., Boucher, J., Murphy, M.B., Thompson, R.C., Jankowska, E., Castillo, A.C., Pilditch, T.D., Dixon, B., Koerselman, L., Kosior, E., Favoino, E., Gutberlet, J., Baulch, S., Atreya, M.E., Fischer, D., He, K.K., Petit, M.M., Sumaila, U.R., Neil, E., Bernhofen, M.V., Lawrence, K., Palardy, J.E., 2020. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. Science 369, 1455–1461. https://doi.org/10.1126/science.aba9475

Law, K.L., 2017. Plastics in the Marine Environment. Annu. Rev. Mar. Sci. 9, 205–229. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060409

Law, K.L., Moret-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. https://doi.org/10.1126/science.1192321

Le Luyer, J., Auffret, P., Quillien, V., Leclerc, N., Reisser, C., Vidal-Dupiol, J., Ky, C.-L., 2019. Whole transcriptome sequencing and biomineralization gene architecture associated with cultured pearl quality traits in the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. BMC Genomics 20. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5443-5

Le Moullac, G., Goyard, E., Saulnier, D., Haffner, P., Thouard, E., Nedelec, G., Goguenheim, J., Rouxel, C., Cuzon, G., 2003. Recent improvements in broodstock management and larviculture in marine species in Polynesia and New Caledonia: genetic and health approaches. Aquaculture 227, 89–106. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00497-6

Le Moullac, G., Schuck, L., Chabrier, S., Belliard, C., Lyonnard, P., Broustal, F., Soyez, C., Saulnier, D., Brahmi, C., Ky, C.-L., Beliaeff, B., 2018. Influence of temperature and pearl rotation on biomineralization in the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. J. Exp. Biol. 221, jeb186858. https://doi.org/10.1242/jeb.186858

Le Moullac, G., Soyez, C., Sham-Koua, M., Levy, P., Moriceau, J., Vonau, V., Maihota, M., Cochard, J.C., 2013. Feeding the pearl oyster *Pinctada margaritifera* during reproductive conditioning. Aquac. Res. 44, 404–411. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03045.x

Le Pabic, L., Parrad, S., Sham Koua, M., Nakasai, S., Saulnier, D., Devaux, D., Ky, C.-L., 2016. Culture site dependence on pearl size realization in *Pinctada margaritifera* in relation to recipient oyster growth and mantle graft biomineralization gene expression using the same donor phenotype. Estuar. Coast. Shelf Sci., SI: Sustainable pearl-culture 182, 294–303. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.009

Le Pennec, M. (Ed.), 2010. Huître perlière et perle de Tahiti. Université de la Polynésie française, Faa'a (Tahiti), France.

Lebreton, L., Andrady, A., 2019. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. Palgrave Commun. 5, 6. https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7

Lebreton, L., Egger, M., Slat, B., 2019. A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. Sci. Rep. 9, 12922. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49413-5

Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., Hajbane, S., Cunsolo, S., Schwarz, A., Levivier, A., Noble, K., Debeljak, P., Maral, H., Schoeneich-Argent, R., Brambini, R., Reisser, J., 2018. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. Sci. Rep. 8, 4666. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w

Lebreton, L., Greer, S.D., Borrero, J.C., 2012. Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. Mar. Pollut. Bull. 64, 653–661. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.027

Lebreton, L., van der Zwet, J., Damsteeg, J.-W., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J., 2017. River plastic emissions to the world's oceans. Nat. Commun. 8, 15611. https://doi.org/10.1038/ncomms15611

Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M., Schludermann, E., 2014. The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. Environ. Pollut. 188, 177–181. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.006

Lee, D.H., Zo, Y.G., Kim, S.J., 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3112–3120.

Lee, H., Shim, W.J., Kwon, J.-H., 2014. Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. Sci. Total Environ. 470–471, 1545–1552. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.023

Lee, K.-W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.-H., 2013. Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. Environ. Sci. Technol. 47, 11278–11283. https://doi.org/10.1021/es401932b

Lee, Y., Whang, I., Umasuthan, N., De Zoysa, M., Oh, C., Kang, D.-H., Choi, C.Y., Park, C.-J., Lee, J., 2011. Characterization of a novel molluscan MyD88 family protein from manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol. 31, 887–893. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.08.003

Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Sci. Total Environ. 619–620, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103

LeMoine, C.M.R., Kelleher, B.M., Lagarde, R., Northam, C., Elebute, O.O., Cassone, B.J., 2018. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Pollut. 243, 591–600. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.084

Lenz, R., Enders, K., Nielsen, T.G., 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E4121–E4122. https://doi.org/10.1073/pnas.1606615113

Leslie, H.A., Brandsma, S.H., van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D., 2017. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. Environ. Int. 101, 133–142. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.018

Li, H.-X., Getzinger, G.J., Ferguson, P.L., Orihuela, B., Zhu, M., Rittschof, D., 2016. Effects of Toxic Leachate from Commercial Plastics on Larval Survival and Settlement of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. Environ. Sci. Technol. 50, 924–931. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02781

Li, J., Liu, H., Paul Chen, J., 2018. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. Water Res. 137, 362–374. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056

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. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.012

Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., Shi, H., 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. Environ. Pollut. 207, 190–195. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.018

Li, R., Zhang, L., Xue, B., Wang, Y., 2019. Abundance and characteristics of microplastics in the mangrove sediment of the semi-enclosed Maowei Sea of the south China sea: New implications for location, rhizosphere, and sediment compositions. Environ. Pollut. 244, 685–692. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.089

Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zhang, S., Zheng, G., Xie, L., Zhang, R., 2016. Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO 2 and temperature. Sci. Rep. 6, 18943. https://doi.org/10.1038/srep18943

Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., 2016. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. Sci. Total Environ. 566–567, 333–349. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084

Liebezeit, G., Dubaish, F., 2012. Microplastics in Beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89, 213–217. https://doi.org/10.1007/s00128-012-0642-7

Liebezeit, G., Liebezeit, E., 2014. Synthetic particles as contaminants in German beers. Food Addit. Contam. Part A 31, 1574–1578. https://doi.org/10.1080/19440049.2014.945099

Liebezeit, G., Liebezeit, E., 2013. Non-pollen particulates in honey and sugar. Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 30, 2136–2140. https://doi.org/10.1080/19440049.2013.843025

Lima, A.R.A., Costa, M.F., Barletta, M., 2014. Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. Environ. Res. 132, 146–155. https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.031

Lin, B., Zhao, H., 2015. Energy efficiency and conservation in China's chemical fiber industry. J. Clean. Prod., Carbon Emissions Reduction: Policies, Technologies, Monitoring, Assessment and Modeling 103, 345–352. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.06.070

Lin, Y.-C., Chen, C.-Y., Chen, H.-L., Hashimoto, T., Chen, S.-A., Li, Y.-C., 2015. Hierarchical self-assembly of nanoparticles in polymer matrix and the nature of the interparticle interaction. J. Chem. Phys. 142, 214905. https://doi.org/10.1063/1.4921567

Linard, C., Gueguen, Y., Moriceau, J., Soyez, C., Hui, B., Raoux, A., Cuif, J.P., Cochard, J.-C., Le Pennec, M., Le Moullac, G., 2011. Calcein staining of calcified structures in pearl oyster *Pinctada margaritifera* and the effect of food resource level on shell growth. Aquaculture 313, 149–155. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.008

Lindeque, P.K., Cole, M., Coppock, R.L., Lewis, C.N., Miller, R.Z., Watts, A.J.R., Wilson-McNeal, A., Wright, S.L., Galloway, T.S., 2020. Are we underestimating microplastic abundance in the marine environment? A comparison of microplastic capture with nets of different mesh-size. Environ. Pollut. 265, 114721. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114721

Lintilhac, J.-P., Durand, A., 1985. Black pearls of Tahiti, South Pacific Publishing. ed.

Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, Å., 2009. Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with Daphnia magna. Chemosphere 74, 1195–1200. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.022

Lithner, D., Larsson, Å., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Sci. Total Environ. 409, 3309–3324. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038

Lithner, D., Nordensvan, I., Dave, G., 2012. Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile–butadiene–styrene, and epoxy to Daphnia magna. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 1763–1772. https://doi.org/10.1007/s11356-011-0663-5

Liu, B., Tan, C., Zhang, D., Chen, M., Niu, Z., Huang, G., Li, Y., Zhang, T., Yu, D., 2017. Genetic parameters of growth and resistance to Polydora ciliata in the pearl oyster *Pinctada fucata*. Aquac. Res. 48, 2039–2046. https://doi.org/10.1111/are.13036

Liu, G., Zhu, Z., Yang, Y., Sun, Y., Yu, F., Ma, J., 2019. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. Environ. Pollut. 246, 26–33. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.100

Liu, J., Wyatt Shields, C., Omofoye, O., Lopez, G.P., 2014. Programmable Anisotropic Microparticles for Self-Assembly Applications. MRS Proc. 1622, 55–60. https://doi.org/10.1557/opl.2014.38

Liu, J., Zhang, T., Tian, L., Liu, X., Qi, Z., Ma, Y., Ji, R., Chen, W., 2019. Aging Significantly Affects Mobility and Contaminant-Mobilizing Ability of Nanoplastics in Saturated Loamy Sand. Environ. Sci. Technol. 53, 5805–5815. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00787

Liu, Z., Cai, M., Wu, D., Yu, P., Jiao, Y., Jiang, Q., Zhao, Y., 2020. Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 256, 113506. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113506

Liubartseva, S., Coppini, G., Lecci, R., Creti, S., 2016. Regional approach to modeling the transport of floating plastic debris in the Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 103, 115–127. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.031

Lo, H.-S., Xu, X., Wong, C.-Y., Cheung, S.-G., 2018. Comparisons of microplastic pollution between mudflats and sandy beaches in Hong Kong. Environ. Pollut. 236, 208–217. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.031

Lobelle, D., Cunliffe, M., 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. Mar. Pollut. Bull. 62, 197–200. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

Löder, M.G.J., Gerdts, G., 2015. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 201–227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_8

Löder, M.G.J., Imhof, H.K., Ladehoff, M., Löschel, L.A., Lorenz, C., Mintenig, S., Piehl, S., Primpke, S., Schrank, I., Laforsch, C., Gerdts, G., 2017. Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. Environ. Sci. Technol. 51, 14283–14292. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03055

Löder, M.G.J., Kuczera, M., Mintenig, S., Lorenz, C., Gerdts, G., 2015. Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. Environ. Chem. 12, 563–581. https://doi.org/10.1071/EN14205

Long, M., Paul-Pont, I., Hégaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. Environ. Pollut. 228, 454–463. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.047

Lorenz, C., Roscher, L., Meyer, M.S., Hildebrandt, L., Prume, J., Löder, M.G.J., Primpke, S., Gerdts, G., 2019. Spatial distribution of microplastics in sediments and surface waters of the southern North Sea. Environ. Pollut. 252, 1719–1729. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.093

Loret, P., Le Gall, S., Dupuy, C., Blanchot, J., Pastoreaud, A., Delesalle, B., Caisey, X., Jonquieres, G., 2000. Heterotrophic protists as a trophic link between picocyanobacteria and the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). Aquat. Microb. Ecol. 22, 215–226.

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lu, K., Qiao, R., An, H., Zhang, Y., 2018. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 202, 514–520. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145

Lucas, J.S., 2008. Chapter 4 - Feeding and Metabolism, in: Southgate, P.C., Lucas, J.S. (Eds.), The Pearl Oyster. Elsevier, London, pp. 103–130. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52976-3.00004-8

Lüchmann, K.H., Clark, M.S., Bainy, A.C.D., Gilbert, J.A., Craft, J.A., Chipman, J.K., Thorne, M.A.S., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Schroeder, D.C., 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. Aquat. Toxicol. 166, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.012

Luna-Jorquera, G., Thiel, M., Portflitt-Toro, M., Dewitte, B., 2019. Marine protected areas invaded by floating anthropogenic litter: An example from the South Pacific. Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst. 29, 245–259. https://doi.org/10.1002/aqc.3095

Luo, H., Xiang, Y., He, D., Li, Y., Zhao, Y., Wang, S., Pan, X., 2019. Leaching behavior of fluorescent additives from microplastics and the toxicity of leachate to *Chlorella vulgaris*. Sci. Total Environ. 678, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.401

Lusher, A., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 245–307. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_10

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.08.023

Lusher, A.L., Hollman, P.C.H., Mendoza-Hill, J.J., 2017a. Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety, FAO Document technique sur les pêches et l'aquaculture. FAO, Rome, Italy.

Lusher, A.L., McHugh, M., Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Mar. Pollut. Bull. 67, 94–99. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028

Lusher, A.L., Tirelli, V., O'Connor, I., Officer, R., 2015. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. Sci. Rep. 5, 14947. https://doi.org/10.1038/srep14947

Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., Cole, M., 2017b. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. Anal. Methods 9, 1346–1360. https://doi.org/10.1039/C6AY02415G

M

Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., Ji, R., 2016. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. Environ. Pollut. 219, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061

Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2015. The point about oxidative stress in molluscs. Invertebr. Surviv. J. ISJ, hal 32.

Mani, T., Hauk, A., Walter, U., Burkhardt-Holm, P., 2015. Microplastics profile along the Rhine River. Sci. Rep. 5, 17988. https://doi.org/10.1038/srep17988

Martinho, G., Balaia, N., Pires, A., 2017. The Portuguese plastic carrier bag tax: The effects on consumers' behavior. Waste Manag. 61, 3–12. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.01.023

Mastrangeli, M., Schill, F., Goldowsky, J., Knapp, H., Brugger, J., Martinoli, A., 2014. Automated real-time control of fluidic self-assembly of microparticles, in: 2014 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA). Presented at the 2014 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), IEEE, Hong Kong, China, pp. 5860–5865. https://doi.org/10.1109/ICRA.2014.6907721

Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.018

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. Environ. Sci. Technol. 35, 318–324. https://doi.org/10.1021/es0010498

Mattsson, K., Ekvall, M.T., Hansson, L.-A., Linse, S., Malmendal, A., Cedervall, T., 2015. Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 49, 553–561. https://doi.org/10.1021/es5053655

Mattsson, K., Johnson, E.V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L.-A., Cedervall, T., 2017. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10813-0

Matzinger, P., 2002. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. Science 296, 301–305. https://doi.org/10.1126/science.1071059

Maximenko, N., Hafner, J., Niiler, P., 2012. Pathways of marine debris derived from trajectories of Lagrangian drifters. Mar. Pollut. Bull. 65, 51–62. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.016

Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A., Zambonino-Infante, J., 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Mar. Environ. Res. 112, 78–85. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.009

McCauley, S.J., Bjorndal, K.A., 1999. Conservation Implications of Dietary Dilution from Debris Ingestion: Sublethal Effects in Post-Hatchling Loggerhead Sea Turtles. Conserv. Biol. 13, 925–929. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98264.x

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE 8, e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Menezes, R.G., Qadir, T.F., Moin, A., Fatima, H., Hussain, S.A., Madadin, M., Pasha, S.B., Al Rubaish, F.A., Senthilkumaran, S., 2017. Endosulfan poisoning: An overview. J. Forensic Leg. Med. 51, 27–33. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.008

Milan, M., Matozzo, V., Pauletto, M., Di Camillo, B., Giacomazzo, M., Boffo, L., Binato, G., Marin, M.G., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2016. Can ecological history influence response to pollutants? Transcriptomic analysis of Manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. Aquat. Toxicol. 174, 123–133. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.024

Mohsen, M., Wang, Q., Zhang, L., Sun, L., Lin, C., Yang, H., 2019. Microplastic ingestion by the farmed sea cucumber Apostichopus japonicus in China. Environ. Pollut. 245, 1071–1078. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.083

Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. Environ. Res. 108, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025

Moore, C.J., Lattin, G.L., Zellers, A.F., 2011. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. Rev. Gest. Costeira Integrada 11, 65–73. https://doi.org/10.5894/rgci194

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.020

Morgana, S., Ghigliotti, L., Estévez-Calvar, N., Stifanese, R., Wieckzorek, A., Doyle, T., Christiansen, J.S., Faimali, M., Garaventa, F., 2018. Microplastics in the Arctic: A case study with sub-surface water and fish samples off Northeast Greenland. Environ. Pollut. 242, 1078–1086. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.001

Moya, A., Huisman, L., Ball, E.E., Hayward, D.C., Grasso, L.C., Chua, C.M., Woo, H.N., Gattuso, J.-P., Forêt, S., Miller, D.J., 2012. Whole Transcriptome Analysis of the Coral *Acropora millepora* Reveals Complex Responses to CO2-driven Acidification during the Initiation of Calcification. Mol. Ecol. 21, 2440–2454. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05554.x

Mu, J., Qu, L., Jin, F., Zhang, S., Fang, C., Ma, X., Zhang, W., Huo, C., Cong, Y., Wang, J., 2019. Abundance and distribution of microplastics in the surface sediments from the northern Bering and Chukchi Seas. Environ. Pollut. 245, 122–130. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.097

Muhammad, G., Atsumi, T., Sunardi, Komaru, A., 2017. Nacre growth and thickness of Akoya pearls from Japanese and Hybrid *Pinctada fucata* in response to the aquaculture temperature condition in Ago Bay, Japan. Aquaculture 477, 35–42. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.032

Munari, C., Infantini, V., Scoponi, M., Rastelli, E., Corinaldesi, C., Mistri, M., 2017. Microplastics in the sediments of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). Mar. Pollut. Bull. 122, 161–165. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.039

Murphy, F., Russell, M., Ewins, C., Quinn, B., 2017. The uptake of macroplastic & microplastic by demersal & pelagic fish in the Northeast Atlantic around Scotland. Mar. Pollut. Bull. 122, 353–359. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.073

Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.032

N

Nabizadeh, R., Sajadi, M., Rastkari, N., Yaghmaeian, K., 2019. Microplastic pollution on the Persian Gulf shoreline: A case study of Bandar Abbas city, Hormozgan Province, Iran. Mar. Pollut. Bull. 145, 536–546. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.048

Naji, A., Esmaili, Z., Khan, F.R., 2017a. Plastic debris and microplastics along the beaches of the Strait of Hormuz, Persian Gulf. Mar. Pollut. Bull. 114, 1057–1062. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.032

Naji, A., Esmaili, Z., Mason, S.A., Dick Vethaak, A., 2017b. The occurrence of microplastic contamination in littoral sediments of the Persian Gulf, Iran. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 20459–20468. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9587-z

Naji, A., Nuri, M., Vethaak, A.D., 2018. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. Environ. Pollut. 235, 113–120. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.046

Napper, I.E., Thompson, R.C., 2016. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. Mar. Pollut. Bull. 112, 39–45. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.025

Natarajan, L., Omer, S., Jetly, N., Jenifer, M.A., Chandrasekaran, N., Suraishkumar, G.K., Mukherjee, A., 2020. Eco-corona formation lessens the toxic effects of polystyrene nanoplastics towards marine microalgae *Chlorella sp*. Environ. Res. 188, 109842. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109842

Nel, H.A., Froneman, P.W., 2015. A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa. Mar. Pollut. Bull. 101, 274–279. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.043

Nelms, S.E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N.J., Deaville, R., Galloway, T.S., Lindeque, P.K., Santillo, D., Godley, B.J., 2019. Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? Sci. Rep. 9, 1075. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37428-3

Nelms, S.E., Duncan, E.M., Broderick, A.C., Galloway, T.S., Godfrey, M.H., Hamann, M., Lindeque, P.K., Godley, B.J., 2016. Plastic and marine turtles: a review and call for research. ICES J. Mar. Sci. J. Cons. 73, 165–181. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv165

Nevo, E., 2011. Evolution Under Environmental Stress at Macro- and Microscales. Genome Biol. Evol. 3, 1039–1052. https://doi.org/10.1093/gbe/evr052

Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Mar. Pollut. Bull. 52, 761–767. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.017

Ning, X., Wang, R., Li, X., Wang, S., Zhang, M., Xing, Q., Sun, Y., Wang, S., Zhang, L., Hu, X., Bao, Z., 2015. Genome-wide identification and characterization of five MyD88 duplication genes in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) and expression changes in response to bacterial challenge. Fish Shellfish Immunol. 46, 181–191. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.028

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.050

Nor, N.H.M., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. Mar. Pollut. Bull. 79, 278–283. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.025

Noventa, S., Hacker, C., Correia, A., Drago, C., Galloway, T., 2018. Gold nanoparticles ingested by oyster larvae are internalized by cells through an alimentary endocytic pathway. Nanotoxicology 12, 901–913. https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1487601

O

Obbard, R.W., 2018. Microplastics in Polar Regions: The role of long range transport. Curr. Opin. Environ. Sci. Health 1, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.004

OECD, 2004. Emission Scenario Document on Plastic Additives, No. 3.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, 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 Biol. Sci. 364, 2047–2062. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242

Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2008. The vegan package [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/profile/Gavin_Simpson/publication/228339454_The_vegan_Package/links/0912f50be86bc29a7f000000/The-vegan-Package.pdf (accessed 7.8.19).

Orset, C., Barret, N., Lemaire, A., 2017. How consumers of plastic water bottles are responding to environmental policies? Waste Manag. 61, 13–27. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.034

Oyake-Ombis, L., van Vliet, B.J.M., Mol, A.P.J., 2015. Managing plastic waste in East Africa: Niche innovations in plastic production and solid waste. Habitat Int. 48, 188–197. https://doi.org/10.1016/j.habitatint.2015.03.019

Özdilek, H.G., 2006. Chelonia mydas L. 1758 (GREEN TURTLE) HATCHLINGS. Fresenius Environ. Bull. 15, 10.

P

Pabortsava, K., Lampitt, R.S., 2020. High concentrations of plastic hidden beneath the surface of the Atlantic Ocean. Nat. Commun. 11, 4073. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17932-9

Pagès, J., Andrefouët, S., Delesalle, B., Prasil, V., 2001. Hydrology and trophic state in Takapoto Atoll lagoon: comparison with other Tuamotu lagoons. Aquat. Living Resour., Pearl oysters in French Polynesia 14, 183–193. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01113-5

Pan, Z., Guo, H., Chen, H., Wang, S., Sun, X., Zou, Q., Zhang, Y., Lin, H., Cai, S., Huang, J., 2019. Microplastics in the Northwestern Pacific: Abundance, distribution, and characteristics. Sci. Total Environ. 650, 1913–1922. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.244

Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., Cachot, J., 2020. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. Environ. Int. 134, 105047. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105047

Park, C.-H., Jeon, H.-S., Yu, H.-S., Han, O.-H., Park, J.-K., 2008. Application of Electrostatic Separation to the Recycling of Plastic Wastes: Separation of PVC, PET, and ABS. Environ. Sci. Technol. 42, 249–255. https://doi.org/10.1021/es070698h

Paul, R., Talukdar, A., Bhattacharya, R., Santra, G., 2013. γ-Benzene hexachloride poisoning leading to acute hepatorenal decompensation. BMJ Case Rep. 2. https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009851

Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P., 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus spp.* to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. Environ. Pollut. 216, 724–737. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039

Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.-L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A., 2018. Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. Front. Mar. Sci. 5. https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252

Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpen, T., Bergmann, M., Hehemann, L., Gerdts, G., 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. Nat. Commun. 9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03825-5

Pelamatti, T., Fonseca-Ponce, I.A., Rios-Mendoza, L.M., Stewart, J.D., Marín-Enríquez, E., Marmolejo-Rodriguez, A.J., Hoyos-Padilla, E.M., Galván-Magaña, F., González-Armas, R., 2019. Seasonal variation in the abundance of marine plastic debris in Banderas Bay, Mexico. Mar. Pollut. Bull. 145, 604–610. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.062

Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C.Q., Yu, H., Ge, C., 2020. Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. Sci. Total Environ. 698, 134254. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134254

Pernet, F., Fuhrmann, M., Petton, B., Mazurié, J., Bouget, J.-F., Fleury, E., Daigle, G., Gernez, P., 2018. Determination of risk factors for herpesvirus outbreak in oysters using a broad-scale spatial epidemiology framework. Sci. Rep. 8, 10869. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29238-4

Pessatti, T.B., Lüchmann, K.H., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bícego, M.C., Dias Bainy, A.C., 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliana* exposed *in situ* to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 131, 172–180. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.003

Phuong, N.N., Poirier, L., Pham, Q.T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? Mar. Pollut. Bull. 129, 664–674. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.054

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. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035

Pittura, L., Avio, C.G., Giuliani, M.E., d'Errico, G., Keiter, S.H., Cormier, B., Gorbi, S., Regoli, F., 2018. Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, Mytilus galloprovincialis. Front. Mar. Sci. 5. https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103

Pivokonsky, M., Cermakova, L., Novotna, K., Peer, P., Cajthaml, T., Janda, V., 2018. Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. Sci. Total Environ. 643, 1644–1651. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.102

PlasticsEurope, 2019. Plastics - the Facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data.

PlasticsEurope, 2016. Plastics - the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Pörtner, H., 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 470, 273–290. https://doi.org/10.3354/meps10123

Poulain, M., Mercier, M.J., Brach, L., Martignac, M., Routaboul, C., Perez, E., Desjean, M.C., ter Halle, A., 2019. Small Microplastics As a Main Contributor to Plastic Mass Balance in the North Atlantic Subtropical Gyre. Environ. Sci. Technol. 53, 1157–1164. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05458

Pouvreau, S., Bodoy, A., Buestel, D., 2000. *In situ* suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: combined effects of body size and weather-related seston composition. Aquaculture 181, 91–113. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00215-X

Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). Aquat. Living Resour. 13, 37–48. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)00135-2

Pouvreau, S., Jonquières, G., Buestel, D., 1999. Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. Aquaculture 176, 295–314. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00102-7

Prokić, M.D., Petrović, T.G., Gavrić, J.P., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Faggio, C., Saičić, Z.S., 2018. Comparative assessment of the antioxidative defense system in subadult and adult anurans: A lesson from the *Bufotes viridis* toad. Zoology 130, 30–37. https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.08.001

Prokić, M.D., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P., Faggio, C., 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. TrAC Trends Anal. Chem. 111, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.001

Q

Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H., Lemos, B., 2019. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. Sci. Total Environ. 662, 246–253. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245

Qu, M., Liu, Y., Xu, K., Wang, D., 2019. Activation of p38 MAPK Signaling-Mediated Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response by Nanopolystyrene Particles. Adv. Biosyst. 3, 1800325. https://doi.org/10.1002/adbi.201800325

Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., Shi, H., 2018. Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. Sci. Total Environ. 621, 679–686. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.284

R

Rehse, S., Kloas, W., Zarfl, C., 2016. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. Chemosphere 153, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.133

Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D.K.A., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Pattiaratchi, C., 2014. Millimeter-Sized Marine Plastics: A New Pelagic Habitat for Microorganisms and Invertebrates. PLoS ONE 9, e100289. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100289

Retama, I., Jonathan, M.P., Shruti, V.C., Velumani, S., Sarkar, S.K., Roy, P.D., Rodríguez-Espinosa, P.F., 2016. Microplastics in tourist beaches of Huatulco Bay, Pacific coast of southern Mexico. Mar. Pollut. Bull. 113, 530–535. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.053

Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Châtel, A., Mouneyrac, C., 2019. Tissue-Specific Biomarker Responses in the Blue Mussel *Mytilus spp*. Exposed to a Mixture of Microplastics at Environmentally Relevant Concentrations. Front. Environ. Sci. 7. https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00033

Rezania, S., Park, J., Md Din, M.F., Mat Taib, S., Talaiekhozani, A., Kumar Yadav, K., Kamyab, H., 2018. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. Mar. Pollut. Bull. 133, 191–208. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.022

Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M., Bebianno, M.J., 2017. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. Mar. Pollut. Bull. 122, 379–391. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.078

Ribeiro-Claro, P., Nolasco, M.M., Araújo, C., 2017. Characterization of Microplastics by Raman Spectroscopy, in: Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier, pp. 119–151. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.10.001

Richards, Z.T., Beger, M., 2011. A quantification of the standing stock of macro-debris in Majuro lagoon and its effect on hard coral communities. Mar. Pollut. Bull. 62, 1693–1701. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.003

Rillig, M.C., Ingraffia, R., de Souza Machado, A.A., 2017. Microplastic Incorporation into Soil in Agroecosystems. Front. Plant Sci. 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01805

Rios, L.M., Jones, P.R., Moore, C., Narayan, U.V., 2010. Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's "eastern garbage patch." J. Environ. Monit. JEM 12, 2226–2236. https://doi.org/10.1039/c0em00239a

Rist, S.E., Assidqi, K., Zamani, N.P., Appel, D., Perschke, M., Huhn, M., Lenz, M., 2016. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. Mar. Pollut. Bull. 111, 213–220. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.006

Ritchie, H., Roser, M., 2018. Plastic Pollution. Our World Data.

Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. TrAC Trends Anal. Chem. 65, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011

Rochman, C.M., 2016a. The Role of Plastic Debris as Another Source of Hazardous Chemicals in Lower-Trophic Level Organisms, in: Takada, H., Karapanagioti, H.K. (Eds.), Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 281–295. https://doi.org/10.1007/698_2016_17

Rochman, C.M., 2016b. Ecologically relevant data are policy-relevant data. Science 352, 1172–1172. https://doi.org/10.1126/science.aaf8697

Rochman, C.M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., Frond, H.D., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S.B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L.M., Zhu, X., Giles, R.K., Hamilton, B.M., Thaysen, C., Kaura, A., Klasios, N., Ead, L., Kim, J., Sherlock, C., Ho, A., Hung, C., 2019. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. Environ. Toxicol. Chem. 38, 703–711. https://doi.org/10.1002/etc.4371

Rochman, C.M., Browne, M.A., Halpern, B.S., Hentschel, B.T., Hoh, E., Karapanagioti, H.K., Rios-Mendoza, L.M., Takada, H., Teh, S., Thompson, R.C., 2013a. Classify plastic waste as hazardous. Nature 494, 169–171. https://doi.org/10.1038/494169a

Rochman, C.M., Browne, M.A., Underwood, A.J., van Franeker, J.A., Thompson, R.C., Amaral-Zettler, L.A., 2016. The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. Ecology 97, 302–312. https://doi.org/10.1890/14-2070.1

Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2013b. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. Sci. Rep. 3, 3263. https://doi.org/10.1038/srep03263

Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. Sci. Total Environ. 493, 656–661. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051

Rochman, C.M., Tahir, A., Williams, S.L., Baxa, D.V., Lam, R., Miller, J.T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., Teh, S.J., 2015. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. Sci. Rep. 5. https://doi.org/10.1038/srep14340

Rodier, M., Longo, S., Henry, K., Ung, A., Lo-Yat, A., Darius, H.T., Viallon, J., Beker, B., Delesalle, B., Chinain, M., 2019. Diversity and toxic potential of algal bloom-forming species from Takaroa lagoon (Tuamotu, French Polynesia): a field and mesocosm study. Aquat. Microb. Ecol. 83, 15–34. https://doi.org/10.3354/ame01900

Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., Fossi, M.C., 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 95, 358–361. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.048

Romera-Castillo, C., Pinto, M., Langer, T.M., Álvarez-Salgado, X.A., Herndl, G.J., 2018. Dissolved organic carbon leaching from plastics stimulates microbial activity in the ocean. Nat. Commun. 9, 1430. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03798-5

Rose, D., Webber, M., 2019. Characterization of microplastics in the surface waters of Kingston Harbour. Sci. Total Environ. 664, 753–760. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.319

Rosenkranz, P., Chaudhry, Q., Stone, V., Fernandes, T.F., 2009. A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2142–2149. https://doi.org/10.1897/08-559.1

Rougerie, F., 1979. Caractéristiques générales du milieu liquide lagonaire de l'atoll de Takapoto. J. Société Océan. 35, 35–45. https://doi.org/10.3406/jso.1979.2991

Rujnić-Sokele, M., Pilipović, A., 2017. Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. Waste Manag. Res. 35, 132–140. https://doi.org/10.1177/0734242X16683272

Rummel, C.D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., Schmitt-Jansen, M., 2017. Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. Lett. 4, 258–267. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00164

Rummel, C.D., Löder, M.G.J., Fricke, N.F., Lang, T., Griebeler, E.-M., Janke, M., Gerdts, G., 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. Mar. Pollut. Bull. 102, 134–141. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.043

Rutledge, D.N., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., 2013. Independent Components Analysis with the JADE algorithm. TrAC Trends Anal. Chem. 50, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.03.013

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 Biol. Sci. 364, 1999–2012. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0207

S

Sadri, S.S., Thompson, R.C., 2014. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. Mar. Pollut. Bull. 81, 55–60. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.020

Sagarin, R.D., Adams, J., Blanchette, C.A., Brusca, R.C., Chorover, J., Cole, J.E., Micheli, F., Munguia-Vega, A., Rochman, C.M., Bonine, K., Haren, J. van, Troch, P.A., 2016. Between control and complexity: opportunities and challenges for marine mesocosms. Front. Ecol. Environ. 14, 389–396. https://doi.org/10.1002/fee.1313

Sauter, E.A., Steele, E.E., 1972. The Effect of Low Level Pesticide Feeding on the Fertility and Hatchability of Chicken Eggs. Poult. Sci. 51, 71–76. https://doi.org/10.3382/ps.0510071

Savina, M., Pouvreau, S., 2004. A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboïdes* and *Glycymeris glycymeris*. Aquaculture 239, 289–306. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.029

Savoca, M.S., Wohlfeil, M.E., Ebeler, S.E., Nevitt, G.A., 2016. Marine plastic debris emits a keystone infochemical for olfactory foraging seabirds. Sci. Adv. 2, e1600395. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600395

Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., Perry, G., 2005. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. Ann. Ist. Super. Sanita 41, 143–164.

Schirinzi, G.F., Pedà, C., Battaglia, P., Laface, F., Galli, M., Baini, M., Consoli, P., Scotti, G., Esposito, V., Faggio, C., Farré, M., Barceló, D., Fossi, M.C., Andaloro, F., Romeo, T., 2020. A new digestion approach for the extraction of microplastics from gastrointestinal tracts (GITs) of the common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) from the western Mediterranean Sea. J. Hazard. Mater. 397, 122794. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122794

Schmidt, C., Krauth, T., Wagner, S., 2017. Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. Environ. Sci. Technol. 51, 12246–12253. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02368

Schür, C., Zipp, S., Thalau, T., Wagner, M., 2020. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 260, 113904. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113904

Schuyler, Q.A., Wilcox, C., Townsend, K., Hardesty, B.D., Marshall, N.J., 2014. Mistaken identity? Visual similarities of marine debris to natural prey items of sea turtles. BMC Ecol. 14, 14. https://doi.org/10.1186/1472-6785-14-14

Schwaferts, C., Niessner, R., Elsner, M., Ivleva, N.P., 2019. Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. TrAC Trends Anal. Chem. 112, 52–65. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.014

Seebacher, F., White, C.R., Franklin, C.E., 2015. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. Nat. Clim. Change 5, 61–66. https://doi.org/10.1038/nclimate2457

Seoane, M., González-Fernández, C., Soudant, P., Huvet, A., Esperanza, M., Cid, Á., Paul-Pont, I., 2019. Polystyrene microbeads modulate the energy metabolism of the marine diatom *Chaetoceros neogracile*. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 251, 363–371. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.142

Serrona, K.R., Yu, J., Che, J., 2010. Managing Wastes in Asia: Looking at the Perspectives of China, Mongolia and the Philippines. Waste Manag. https://doi.org/10.5772/8457

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. Environ. Pollut. 185, 77–83. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013

Seymour, R.B., Mark, H.F., Pauling, L., Fisher, C.H., Stahl, G.A., Sperling, L.H., Marvel, C.S., Carraher, C.E., 1989. Pre-Twentieth Century Polymer Pioneers. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2407-9_1

Shim, W.J., Hong, S.H., Eo, S.E., 2017. Identification methods in microplastic analysis: a review. Anal. Methods 9, 1384–1391. https://doi.org/10.1039/C6AY02558G

Shrivastava, A., Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron. Young Sci. 2, 21. https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345

Sjödin, A., Jones, R.S., Lapeza, C.R., Focant, J.-F., McGahee, E.E., Patterson, D.G., 2004. Semiautomated high-throughput extraction and cleanup method for the measurement of polybrominated diphenyl ethers, polybrominated biphenyls, and polychlorinated biphenyls in human serum. Anal. Chem. 76, 1921–1927. https://doi.org/10.1021/ac030381+

Smith, M., Love, D.C., Rochman, C.M., Neff, R.A., 2018. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. Curr. Environ. Health Rep. 5, 375–386. https://doi.org/10.1007/s40572-018-0206-z

Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. Integr. Comp. Biol. 53, 597–608. https://doi.org/10.1093/icb/ict028

Song, Y.K., Hong, S.H., Eo, S., Jang, M., Han, G.M., Isobe, A., Shim, W.J., 2018. Horizontal and Vertical Distribution of Microplastics in Korean Coastal Waters. Environ. Sci. Technol. 52, 12188–12197. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04032

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Jung, S.W., Shim, W.J., 2017. Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. Environ. Sci. Technol. 51, 4368–4376. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06155

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Rani, M., Lee, J., Shim, W.J., 2015a. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. Mar. Pollut. Bull. 93, 202–209. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.01.015

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Shim, W.J., 2015b. Occurrence and Distribution of Microplastics in the Sea Surface Microlayer in Jinhae Bay, South Korea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 279–287. https://doi.org/10.1007/s00244-015-0209-9

Song, Z., Yang, X., Chen, F., Zhao, F., Zhao, Y., Ruan, L., Wang, Y., Yang, Y., 2019. Fate and transport of nanoplastics in complex natural aquifer media: Effect of particle size and surface functionalization. Sci. Total Environ. 669, 120–128. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.102

Southgate, P., Lucas, J., 2008. The Pearl Oyster, Elsevier Science. ed.

Sparks, C., 2020. Microplastics in Mussels Along the Coast of Cape Town, South Africa. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 104, 423–431. https://doi.org/10.1007/s00128-020-02809-w

Stapleton, P., 2019. Toxicological considerations of nano-sized plastics. AIMS Environ. Sci. 6, 367–378. https://doi.org/10.3934/environsci.2019.5.367

Statista, 2019. Chemicals & Resources - Chemical Industry - Global chemical fiber production from 2000 to 2018.

Suaria, G., Perold, V., Lee, J.R., Lebouard, F., Aliani, S., Ryan, P.G., 2020. Floating macro- and microplastics around the Southern Ocean: Results from the Antarctic Circumnavigation Expedition. Environ. Int. 136, UNSP 105494. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105494

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 2430–2435. https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113

Sutton, R., Mason, S.A., Stanek, S.K., Willis-Norton, E., Wren, I.F., Box, C., 2016. Microplastic contamination in the San Francisco Bay, California, USA. Mar. Pollut. Bull. 109, 230–235. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.077

Syberg, K., Khan, F.R., Selck, H., Palmqvist, A., Banta, G.T., Daley, J., Sano, L., Duhaime, M.B., 2015. Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned: Microplastics ecological risk. Environ. Toxicol. Chem. 34, 945–953. https://doi.org/10.1002/etc.2914

T

Tallec, K., 2019. Impacts des micro- et nanoplastiques sur les jeunes stades de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thèse de doctorat). Brest.

Tallec, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A., Paul-Pont, I., 2019. Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. Chemosphere 225, 639–646. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077

Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goïc, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. Environ. Pollut. 242, 1226–1235. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.020

Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2079–2096. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0281

Tamminga, M., Hengstmann, E., Fischer, E.K., 2018. Microplastic analysis in the South Funen Archipelago, Baltic Sea, implementing manta trawling and bulk sampling. Mar. Pollut. Bull. 128, 601–608. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.066

Tang, J., Ni, X., Zhou, Z., Wang, L., Lin, S., 2018. Acute microplastic exposure raises stress response and suppresses detoxification and immune capacities in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. Environ. Pollut. 243, 66–74. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.045

Taylor, J.K., 1981. Quality assurance of chemical measurements. Anal. Chem. 53, 1588A-1596A. https://doi.org/10.1021/ac00237a001

Teaniniuraitemoana, V., Leprêtre, M., Levy, P., Vanaa, V., Parrad, S., Gaertner-Mazouni, N., Gueguen, Y., Huvet, A., Moullac, G.L., 2016. Effect of temperature, food availability, and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol. 325, 13–24. https://doi.org/10.1002/jez.1992

Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. Environ. Sci. Technol. 51, 13689–13697. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667

Ter Halle, A., Ladirat, L., Gendre, X., Goudouneche, D., Pusineri, C., Routaboul, C., Tenailleau, C., Duployer, B., Perez, E., 2016. Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. Environ. Sci. Technol. 50, 5668–5675. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00594

Terepocki, A.K., Brush, A.T., Kleine, L.U., Shugart, G.W., Hodum, P., 2017. Size and dynamics of microplastic in gastrointestinal tracts of Northern Fulmars (*Fulmarus glacialis*) and Sooty Shearwaters (Ardenna grisea). Mar. Pollut. Bull. 116, 143–150. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.064

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2027–2045. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284

Thiel, M., Hinojosa, I.A., Miranda, L., Pantoja, J.F., Rivadeneira, M.M., Vásquez, N., 2013. Anthropogenic marine debris in the coastal environment: a multi-year comparison between coastal waters and local shores. Mar. Pollut. Bull. 71, 307–316. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.005

Thielley, M., 1993. Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L) var. cumingii (Jameson), (mollusques, bivalves). Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould). Université Française du Pacifique.

Thomas, Y., Dumas, F., Andréfouët, S., 2016. Larval connectivity of pearl oyster through biophysical modelling; evidence of food limitation and broodstock effect. Estuar. Coast. Shelf Sci., SI: Sustainable pearl-culture 182, 283–293. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.010

Thompson, R.C., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 185–200. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_7

Thompson, R.C., 2004. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? Science 304, 838–838. https://doi.org/10.1126/science.1094559

Thompson, R.C., Moore, C.J., vom Saal, F.S., Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2153–2166. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053

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. https://doi.org/10.1126/science.1094559

Toubiana, M., Gerdol, M., Rosani, U., Pallavicini, A., Venier, P., Roch, P., 2013. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. Dev. Comp. Immunol. 40, 158–166. https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.02.006

Tournier, V., Topham, C.M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M.-L., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., Marty, A., 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. Nature 580, 216–219. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4

Trillat, A. (1861-1944) A. du texte, 1896. Le formaldéhyde et ses applications pour la désinfection des locaux contaminés : propriétés physiologiques, analyse des principaux travaux, expériences diverses / par A. Trillat.

Trotignon, J.-P., Verdu, J., Dobraczynski, A., Piperaud, M., 2006. Matières Plastiques. Structures-propriétés, mise en oeuvre, normalisation, in: Matières Plastiques, AFNOR. p. 239.

| U |

UE, 2008. Priority Substances and Certain Other Pollutants according to Annex II of Directive 2008/105/EC - Environment - European Commission [WWW Document]. URL https://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_substances.htm (accessed 11.18.19).

UNEP, 2014. Valuing Plastic: The Business Case for Measuring, Managing and Disclosing Plastic Use in the Consumer Goods Industry.

US EPA National Center for Environmental Assessment, I.O., Newhouse, K., 2014. IRIS Toxicological Review of Benzo[a]pyrene (External Review Draft) [WWW Document]. URL https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=280022 (accessed 11.18.19).

| V |

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015a. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. Environ. Pollut. 199, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.008

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C.R., 2015b. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. Mar. Environ. Res. 111, 5–17. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007

Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environ. Pollut. 193, 65–70. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. Environ. Pollut. 182, 495–499. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.013

van der Hal, N., Ariel, A., Angel, D.L., 2017. Exceptionally high abundances of microplastics in the oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 116, 151–155. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.052

van Franeker, J.A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., Hansen, P.-L., Heubeck, M., Jensen, J.-K., Le Guillou, G., Olsen, B., Olsen, K.-O., Pedersen, J., Stienen, E.W.M., Turner, D.M., 2011. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. Environ. Pollut., Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity 159, 2609–2615. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.008

van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B.D., van Franeker, J.A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., Law, K.L., 2015. A global inventory of small floating plastic debris. Environ. Res. Lett. 10, 124006. https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124006

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., Pressures, Stresses, Shocks and Trends in Estuarine Ecosystems 130, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.03.022

von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. Environ. Sci. Technol. 46, 11327–11335. https://doi.org/10.1021/es302332w

W

Wagner, S., Reemtsma, T., 2019. Things we know and don't know about nanoplastic in the environment. Nat. Nanotechnol. 14, 300–301. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0424-z

Wang, C., Yang, L., Wang, S., Zhang, Z., Yu, Y., Wang, M., Cromie, M., Gao, W., Wang, S.-L., 2016. The classic EDCs, phthalate esters and organochlorines, in relation to abnormal sperm quality: a systematic review with meta-analysis. Sci. Rep. 6, 19982. https://doi.org/10.1038/srep19982

Wang, G., Ding, Q., Hou, Z., 2008. Independent component analysis and its applications in signal processing for analytical chemistry. TrAC Trends Anal. Chem. 27, 368–376. https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.009

Wang, J., Wang, M., Ru, S., Liu, X., 2019. High levels of microplastic pollution in the sediments and benthic organisms of the South Yellow Sea, China. Sci. Total Environ. 651, 1661–1669. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.007

Wang, L., Peng, Y., Nie, X., Pan, B., Ku, P., Bao, S., 2016. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 179, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.010

Wang, L., Song, X., Song, L., 2018. The oyster immunity. Dev. Comp. Immunol., Aqua species immunity 80, 99–118. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025

Wang, T., Zou, X., Li, B., Yao, Y., Zang, Z., Li, Y., Yu, W., Wang, W., 2019. Preliminary study of the source apportionment and diversity of microplastics: Taking floating microplastics in the South China Sea as an example. Environ. Pollut. 245, 965–974. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.110

Wang, Z., Lin, T., Chen, W., 2020. Occurrence and removal of microplastics in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP). Sci. Total Environ. 700, 134520. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134520

Wardrop, P., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P.D., Miranda, A., Tang, M., Clarke, B.O., 2016. Chemical Pollutants Sorbed to Ingested Microbeads from Personal Care Products Accumulate in Fish. Environ. Sci. Technol. 50, 4037–4044. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06280

Waters, C.N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A.D., Poirier, C., Gałuszka, A., Cearreta, A., Edgeworth, M., Ellis, E.C., Ellis, M., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J.R., Richter, D. deB, Steffen, W., Syvitski, J., Vidas, D., Wagreich, M., Williams, M., Zhisheng, A., Grinevald, J., Odada, E., Oreskes, N., Wolfe, A.P., 2016. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. Science 351. https://doi.org/10.1126/science.aad2622

Watts, A.J.R., Urbina, M.A., Corr, S., Lewis, C., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of Plastic Microfibers by the Crab *Carcinus maenas* and Its Effect on Food Consumption and Energy Balance. Environ. Sci. Technol. 49, 14597–14604. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04026

Watts, A.J.R., Urbina, M.A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C., Galloway, T.S., 2016. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab *Carcinus maenas*. Environ. Sci. Technol. 50, 5364–5369. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01187

Wedemeyer-Strombel, K.R., Balazs, G.H., Johnson, J.B., Peterson, T.D., Wicksten, M.K., Plotkin, P.T., 2015. High frequency of occurrence of anthropogenic debris ingestion by sea turtles in the North Pacific Ocean. Mar. Biol. 162, 2079–2091. https://doi.org/10.1007/s00227-015-2738-1

Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E.M., Kamermans, P., Koelmans, A.A., 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). Environ. Toxicol. Chem. 31, 2490–2497. https://doi.org/10.1002/etc.1984

Weiner, S., 1986. Organization of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth. CRC Crit. Rev. Biochem. 20, 365–408. https://doi.org/10.3109/10409238609081998

Weinstein, J.E., Crocker, B.K., Gray, A.D., 2016. From macroplastic to microplastic: Degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1632–1640. https://doi.org/10.1002/etc.3432

Wen, B., Zhang, N., Jin, S.-R., Chen, Z.-Z., Gao, J.-Z., Liu, Y., Liu, H.-P., Xu, Z., 2018. Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid. Aquat. Toxicol. 195, 67–76. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.010

Wesch, C., Elert, A.M., Wörner, M., Braun, U., Klein, R., Paulus, M., 2017. Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data. Sci. Rep. 7, 5424. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05838-4

Wessel, C.C., Lockridge, G.R., Battiste, D., Cebrian, J., 2016. Abundance and characteristics of microplastics in beach sediments: Insights into microplastic accumulation in northern Gulf of Mexico estuaries. Mar. Pollut. Bull. 109, 178–183. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.002

Whitesides, G.M., Grzybowski, B., 2002. Self-assembly at all scales. Science 295, 2418–2421. https://doi.org/10.1126/science.1070821

Widmer, W.M., Hennemann, M.C., 2010. Marine Debris in the Island of Santa Catarina, South Brazil: Spatial Patterns, Composition, and Biological Aspects. J. Coast. Res. 26, 993–1000. https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-09-00072.1

Wikström, F., Williams, H., Venkatesh, G., 2016. The influence of packaging attributes on recycling and food waste behaviour – An environmental comparison of two packaging alternatives. J. Clean. Prod. 137, 895–902. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.097

Woodall, L.C., Gwinnett, C., Packer, M., Thompson, R.C., Robinson, L.F., Paterson, G.L.J., 2015. Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibres in marine sediments. Mar. Pollut. Bull. 95, 40–46. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.044

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, 140317–140317. https://doi.org/10.1098/rsos.140317

Worm, B., Lotze, H.K., Jubinville, I., Wilcox, C., Jambeck, J., 2017. Plastic as a Persistent Marine Pollutant. Annu. Rev. Environ. Resour. 42, 1–26. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102016-060700

Wright, S.L., Kelly, F.J., 2017. Plastic and Human Health: A Micro Issue? Environ. Sci. Technol. 51, 6634–6647. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423

Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013a. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Curr. Biol. 23, R1031–R1033. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.068

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013b. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environ. Pollut. 178, 483–492. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031

Wu, N., Zhang, Y., Zhang, X., Zhao, Z., He, J., Li, W., Ma, Y., Niu, Z., 2019. Occurrence and distribution of microplastics in the surface water and sediment of two typical estuaries in Bohai Bay, China. Environ. Sci. Process. Impacts 21, 1143–1152. https://doi.org/10.1039/C9EM00148D

Wu, T.D., Reeder, J., Lawrence, M., Becker, G., Brauer, M.J., 2016. GMAP and GSNAP for Genomic Sequence Alignment: Enhancements to Speed, Accuracy, and Functionality, in: Mathé, E., Davis, S. (Eds.), Statistical Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 283–334. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_15

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23, 8244–8259. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x

Wu, X., Pan, J., Li, M., Li, Y., Bartlam, M., Wang, Y., 2019. Selective enrichment of bacterial pathogens by microplastic biofilm. Water Res. 165, 114979. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114979

X

Xin, L., Wang, M., Zhang, H., Li, M., Wang, H., Wang, L., Song, L., 2016. The categorization and mutual modulation of expanded MyD88s in *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 54, 118–127. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.014

Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., Miao, A.-J., 2020. Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. Sci. Total Environ. 703, 134699. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134699

Y

Yanar, D.K., Kwetkus, B.A., 1995. Electrostatic separation of polymer powders. J. Electrost., Selected papers from the special technical session “Electrostatics in Polymer Processing and Charge Monitoring”, 1993 IEEE Industry Applications Society Meeting 35, 257–266. https://doi.org/10.1016/0304-3886(94)00044-W

Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., Kolandhasamy, P., 2015. Microplastic Pollution in Table Salts from China. Environ. Sci. Technol. 49, 13622–13627. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03163

Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., Liu, W., 2019. Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. Environ. Int. 123, 79–86. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.061

Yarra, T., Gharbi, K., Blaxter, M., Peck, L.S., Clark, M.S., 2016. Characterization of the mantle transcriptome in bivalves: *Pecten maximus*, *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*. Mar. Genomics, Cells to Shells: The genomics of mollusc exoskeletons 27, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.003

Ye, S., Andrady, A.L., 1991. Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions. Mar. Pollut. Bull. 22, 608–613. https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90249-R

Ye, X., Zhou, X., Hennings, R., Kramer, J., Calafat, A.M., 2013. Potential External Contamination with Bisphenol A and Other Ubiquitous Organic Environmental Chemicals during Biomonitoring Analysis: An Elusive Laboratory Challenge. Environ. Health Perspect. 121, 283–286. https://doi.org/10.1289/ehp.1206093

Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., Qu, K., 2018. Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacopever (*Sebastes schlegelii*). J. Hazard. Mater. 360, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.110

Yuan, W., Liu, X., Wang, W., Di, M., Wang, J., 2019. Microplastic abundance, distribution and composition in water, sediments, and wild fish from Poyang Lake, China. Ecotoxicol. Environ. Saf. 170, 180–187. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.126

Yukihira, H., Lucas, J.S., Klumpp, D.W., 2000. Comparative effects of temperature on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195, 179–188. http://dx.doi.org/10.3354/meps195179

Z

Zanini, J.-M., 1999. Stocks naturels de nacres - pinctada margaritifera - de polynesie francaise (These de doctorat). Paris, EPHE.

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. https://doi.org/10.1021/es401288x

Zhang, B., Wu, D., Yang, X., Teng, J., Liu, Yongliang, Zhang, C., Zhao, J., Yin, X., You, L., Liu, Yanfang, Wang, Q., 2019. Microplastic pollution in the surface sediments collected from Sishili Bay, North Yellow Sea, China. Mar. Pollut. Bull. 141, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.021

Zhang, C., Zhou, H., Cui, Y., Wang, C., Li, Y., Zhang, D., 2019. Microplastics in offshore sediment in the Yellow Sea and East China Sea, China. Environ. Pollut. 244, 827–833. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.102

Zhang, D., Cui, Y., Zhou, H., Jin, C., Yu, X., Xu, Y., Li, Y., Zhang, C., 2020. Microplastic pollution in water, sediment, and fish from artificial reefs around the Ma'an Archipelago, Shengsi, China. Sci. Total Environ. 703, 134768. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134768

Zhang, Q., Qu, Q., Lu, T., Ke, M., Zhu, Y., Zhang, M., Zhang, Z., Du, B., Pan, X., Sun, L., Qian, H., 2018. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. Environ. Pollut. 243, 1106–1112. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.073

Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., Lin, X., Ma, D., 2017. Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. Environ. Pollut. 231, 541–548. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.058

Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K.L., Yu, Z., 2013. Characteristic and Functional Analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity. PLOS ONE 8, e76464. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076464

Zhao, S., Danley, M., Ward, J.E., Li, D., Mincer, T.J., 2017. An approach for extraction, characterization and quantitation of microplastic in natural marine snow using Raman microscopy. Anal. Methods 9, 1470–1478. https://doi.org/10.1039/C6AY02302A

Zhao, S., Zhu, L., Li, D., 2015. Microplastic in three urban estuaries, China. Environ. Pollut. 206, 597–604. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.027

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.032

Zheng, Y., Li, J., Cao, W., Liu, X., Jiang, F., Ding, J., Yin, X., Sun, C., 2019. Distribution characteristics of microplastics in the seawater and sediment: A case study in Jiaozhou Bay, China. Sci. Total Environ. 674, 27–35. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.008

Zhu, L., Bai, H., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Xia, B., 2018. Microplastic pollution in North Yellow Sea, China: Observations on occurrence, distribution and identification. Sci. Total Environ. 636, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.182

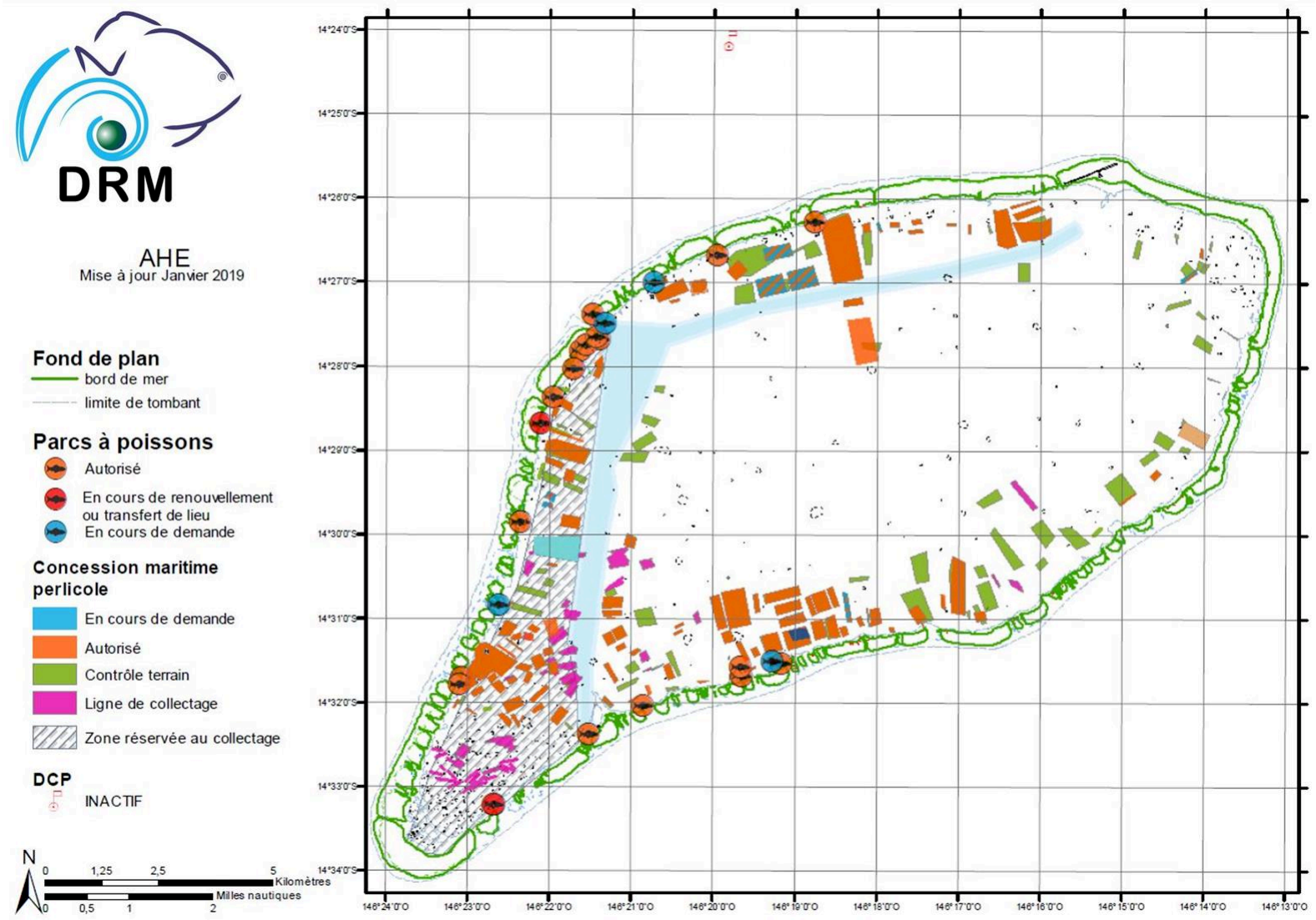
Zimmermann, L., Dierkes, G., Ternes, T.A., Völker, C., Wagner, M., 2019. Benchmarking the *in Vitro* Toxicity and Chemical Composition of Plastic Consumer Products. Environ. Sci. Technol. 53, 11467–11477. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02293

Zobkov, M., Esiukova, E., 2017. Microplastics in Baltic bottom sediments: Quantification procedures and first results. Mar. Pollut. Bull. 114, 724–732. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.060

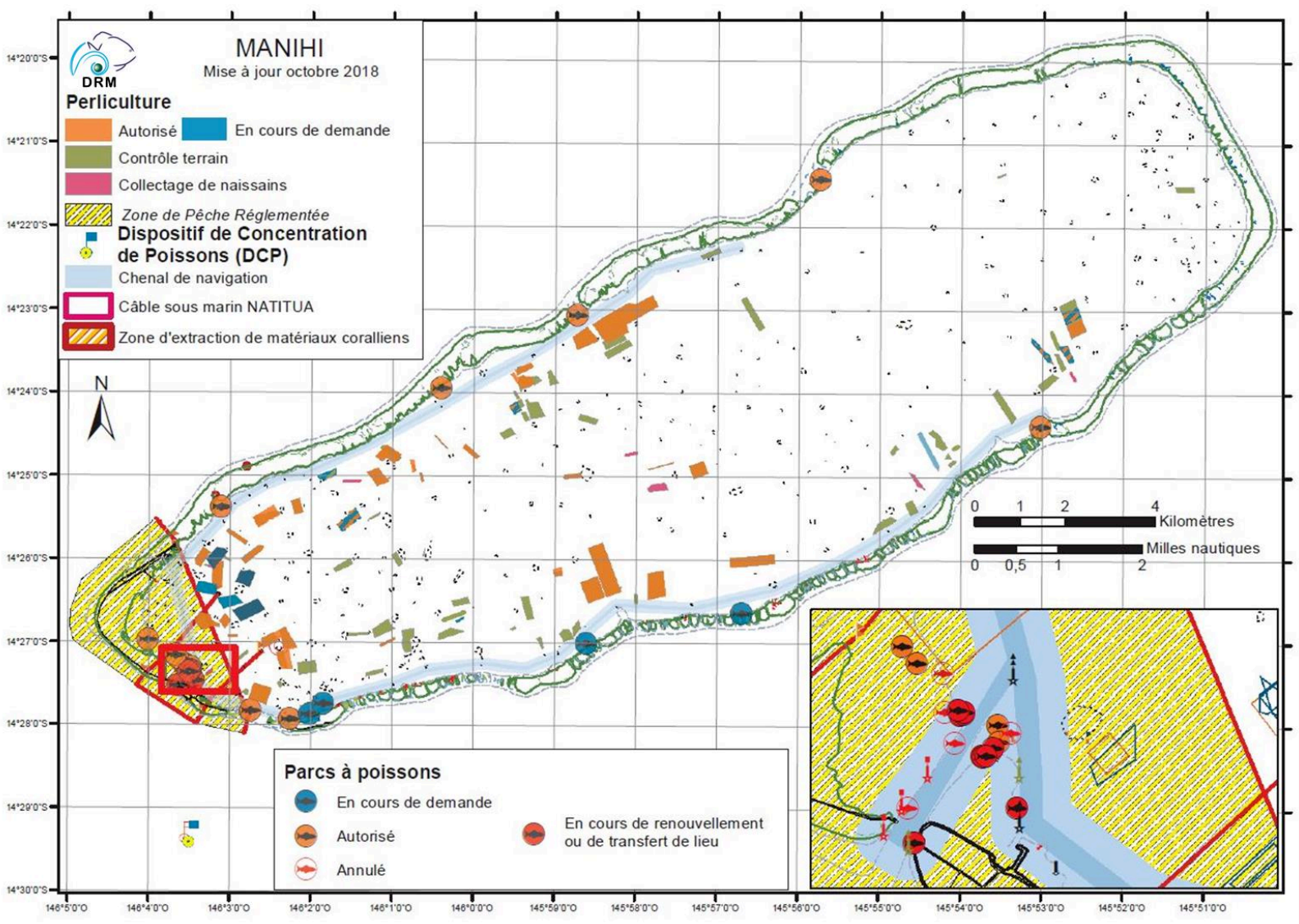
ANNEXES

Annexe 1. Activité perlicole sur l'atoll de Ahe 344
Annexe 2. Activité perlicole sur l'atoll de Manihi 345
Annexe 3. Activité perlicole sur l'atoll de Takaroa 346
Annexe 4. Activité perlicole sur l'atoll de Takapoto 347
Annexe 5. Activité perlicole sur l'archipel des Gambier 348
Annexe 6. Coordonnées GPS des zones de prélèvements d'eau et d'huîtres perlières 349

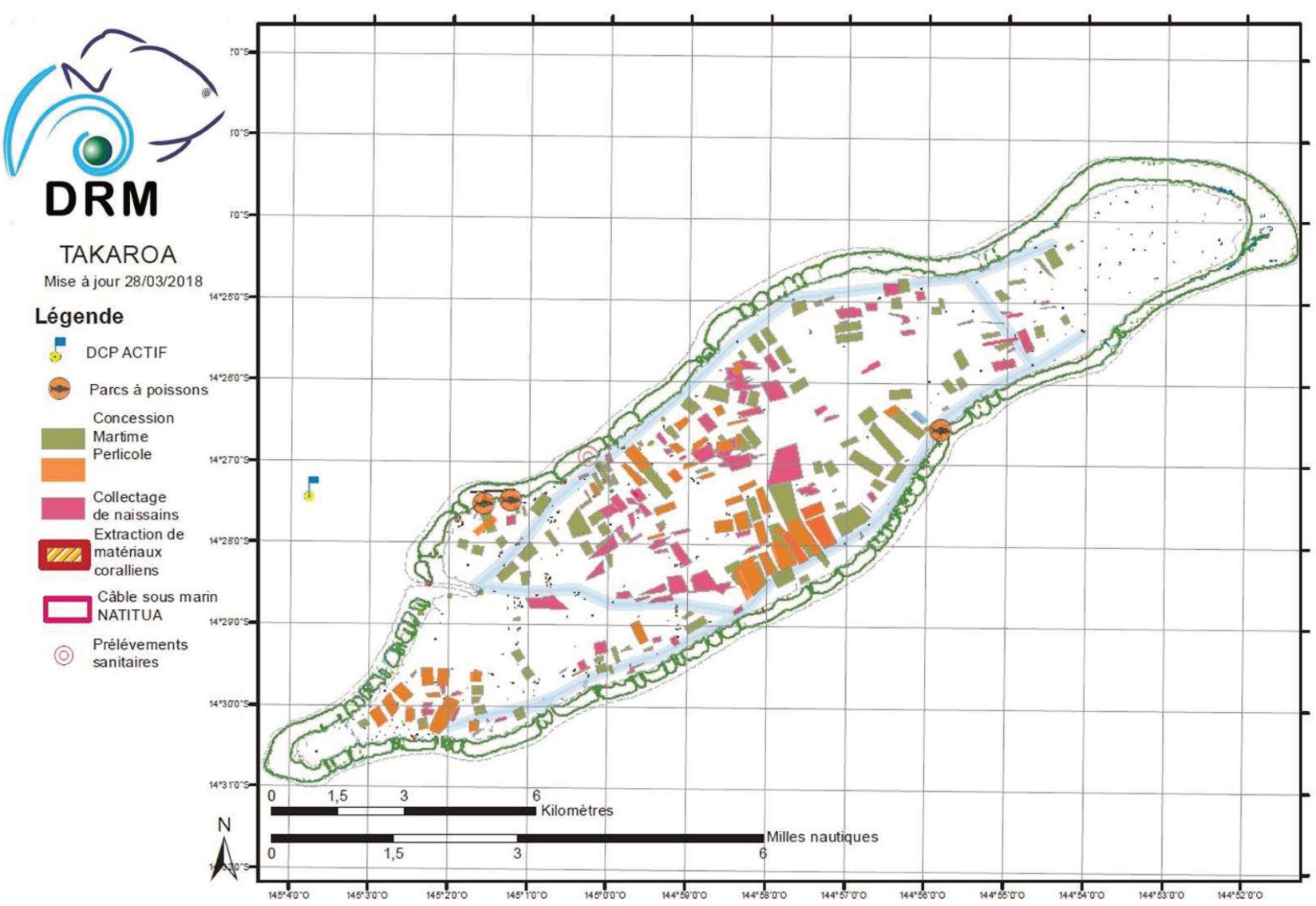
Annexe 1. Activité perlicole sur l'atoll de Ahe



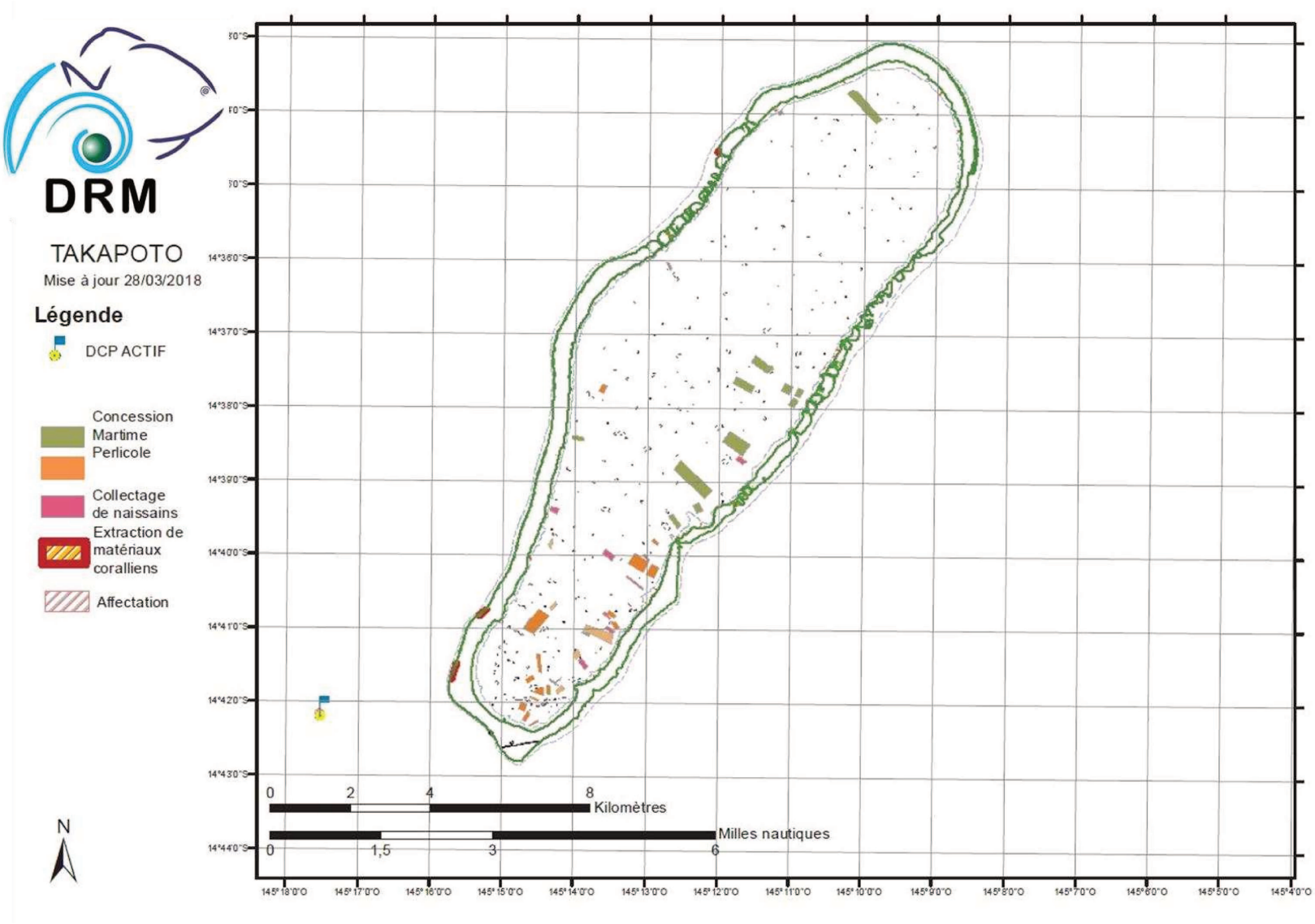
Annexe 2. Activité perlicole sur l'atoll de Manihi



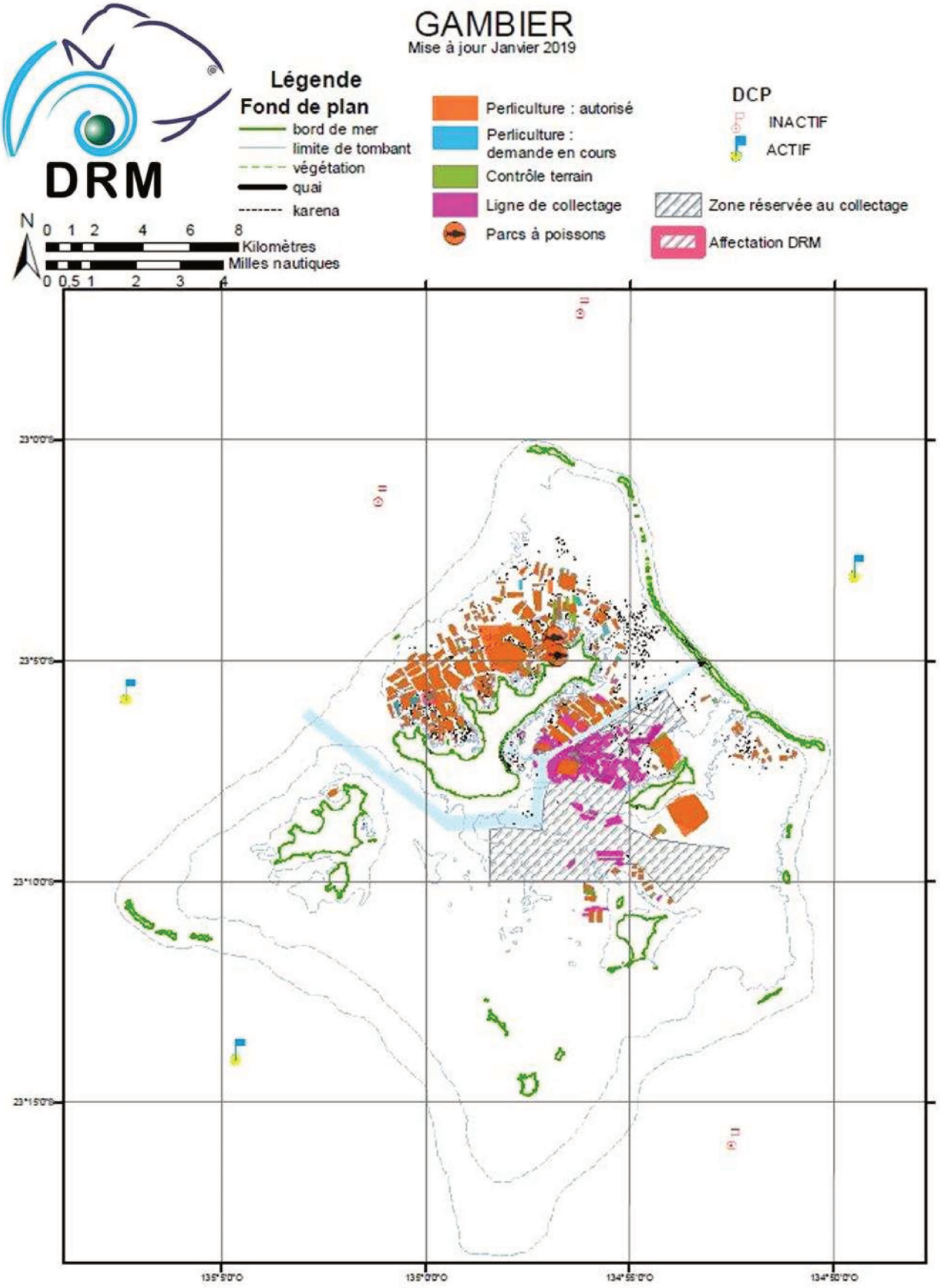
Annexe 3. Activité perlicole sur l'atoll de Takaroa



Annexe 4. Activité perlicole sur l'atoll de Takapoto



Annexe 5. Activité perlicole sur l'archipel des Gambier



Annexe 6. Coordonnées GPS des zones de prélèvements d'eau et d'huîtres perlières

Station	**Site d'étude**					
	Ahe	**Manihi**	**Takaroa**	**Takapoto**	**Mangareva**	
*Prélèvements d'eau**	335/80/40 µm	335/80/40 µm	335/80/40 µm	335/80/40 µm	335 µm	80/40 µm
1	14°33'08"S 146°23'24"O	14°26'36"S 146°03'46"O	14°28'30"S 145°02'35"O	14°41'52"S 145°15'13"O	23°01'25"S 134°57'03"O	23°05'64"S 134°58'98"O
2	14°32'23"S 146°22'52"O	14°25'44"S 146°02'17"O	14°30'29"S 145°03'53"O	14°40'28"S 145°14'39"O	23°04'27"S 134°59'29"O	23°06'58"S 134°59'94"O
3	14°31'27"S 146°22'30"O	14°26'35"S 146°01'07"O	14°30'13"S 145°03'14"O	14°39'26"S 145°13'08"O	23°06'55"S 135°01'45"O	23°07'28"S 135°01'73"O
4	14°31'20"S 146°20'35"O	14°25'28"S 145°59'01"O	14°28'10"S 145°00'20"O	14°38'12"S 145°13'53"O	23°09'49"S 135°05'54"O	23°07'94"S 135°00'63"O
5	14°29'29"S 146°21'29"O	14°23'02"S 145°57'36"O	14°27'22"S 144°58'52"O	14°37'49"S 145°11'59"O	23°12'10"S 135°00'04"O	23°08'50"S 134°58'15"O
6	14°27'03"S 146°19'01"O	14°24'56"S 145°55'49"O	14°26'38"S 144°57'50"O	14°36'37"S 145°13'09"O	23°10'06"S 134°58'22"O	23°07'23"S 134°57'30"O
7	14°28'34"S 146°18'16"O	14°23'01"S 145°55'16"O	14°25'24"S 144°55'54"O	14°36'23"S 145°10'59"O	23°06'59"S 134°57'19"O	23°05'70"S 134°55'95"O
8	14°29'03"S 146°15'50"O	14°21'38"S 145°54'38"O	14°24'40"S 144°54'30"O	14°35'19"S 145°10'00"O	23°04'40"S 134°55'53"O	23°05'22"S 134°55'65"O
9	14°26'46"S 146°15'01"O	14°21'59"S 145°52'26"O	14°24'03"S 144°53'10"O	14°34'57"S 145°11'46"O	23°05'34"S 134°54'13"O	23°04'45"S 134°56'42"O
10	-	-	-	14°33'51"S 145°10'15"O	23°10'55"S 134°53'11"O	23°05'32"S 134°57'94"O
11	-	-	-	-	23°12'40"S 134°56'05"O	-
12	-	-	-	-	23°15'25"S 134°53'24"O	-
Passe (courant entrant)	14°27'52"S 146°21'21"O	14°27'52"S 146°03'67"O	14°28'34"S 145°01'45"O	-	-	-
Passe (courant sortant)	14°27'48"S 146°21'50"O	14°27'56"S 146°03'71"O	14°28'30"S 145°02'28"O	-	-	-
Prélèvements d'huîtres						
Ferme perlière 1	14°27'48"S 146°21'52"O	14°23'37"S 145°59'13"O	14°28'14"S 144°57'04"O	14°37'96"S 145°10'80"O	23°04'46"S 134°58'39"O	
Ferme perlière 2	14°31'23" S 146°22'27" O	-	14°28'19"S 144°57'10"O	14°41'44"S 145°14'30"O	23°06'76"S 134°59'35"O	

* Les coordonnées GPS associées aux prélèvements d'eau de surface à 335 et 80 µm correspondent aux coordonnées GPS de départ des traits de filet.

Titre : Contamination en microplastiques dans les lagons perlicoles de Polynésie française et leurs impacts sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera*

Résumé : La pollution plastique du milieu marin est un enjeu mondial sur le plan environnemental, sanitaire et socio-économique. En Polynésie française, une source spécifique de déchets plastiques est associée à la perliculture dont les structures d'élevage s'amoncellent dans les lagons depuis plus de 40 ans. Ce gisement de plastique est susceptible de se dégrader sous la forme de micro- et nanoplastiques (MNP, < 5 mm) dont la contamination ubiquitaire à l'échelle mondiale suscite une grande préoccupation à cause des risques qu'elle représente pour les organismes et les écosystèmes marins. Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer la contamination microplastique (MP) dans les lagons perlicoles de Polynésie française et d'en évaluer les effets sur l'huître perlière (*Pinctada margaritifera*). Les résultats des campagnes d'échantillonnages réalisées *in situ* dans les atolls de Ahe, Manihi et Takaroa ont révélé l'omniprésence des MP dans les eaux de surface, la colonne d'eau et les tissus d'huîtres perlières en élevage. Les concentrations enregistrées dans les eaux de surface (0,2 à 8,4 MP.m^{-3}) placent ces trois atolls à une position très défavorable par rapport aux concentrations en MP mesurées dans le monde. De plus, la colonne d'eau s'est révélée être un compartiment hautement contaminé (14,0 à 716,2 MP.m^{-3}). L'huître perlière, organisme filtreur élevé entre 4 et 6 mètres de profondeur, est particulièrement vulnérable à cette contamination. Les concentrations mesurées dans les tissus de *P. margaritifera* (~ 0,3-21,5 MP.g^{-1} de chair humide) la positionne d'ailleurs parmi les bivalves marins les plus contaminés. Afin d'évaluer l'impact des MP sur la biologie de *P. margaritifera* et la qualité de la perle, deux expérimentations *in vivo* ont été menées en conditions contrôlées de laboratoire : l'une impliquant des microbilles de polystyrène (micro-PS standardisées) et l'autre impliquant des MNP produits à partir de structures perlicoles récoltées *in situ* dont une dose d'exposition faible proche d'un scenario environnemental. Les résultats de ces travaux ont révélé un impact important des micro-PS et des MNP perlicoles sur le métabolisme énergétique des individus exposés. Cette altération s'est traduite par une diminution de l'efficacité d'assimilation entraînant une réduction dose-dépendante de gain d'énergie. Ce dérèglement énergétique s'est répercuté au niveau cellulaire (*i.e.* altération de la gamétogénèse) et moléculaire (*i.e.* modulation de l'expression des gènes impliqués dans des mécanismes de défense face au stress). Par ailleurs, la qualité de la perle s'est avérée impactée au niveau de la microstructure des dépôts nacriers. Une approche toxicologique menée en parallèle sur les plastiques perlicoles a permis de démontrer leur potentiel de toxicité chimique à travers une désorption importante d'additifs (*e.g.* phtalates) dans l'eau de mer (*i.e.* lixiviats). Des embryons de *P. margaritifera* ont été exposés à ces lixiviats et une altération du développement embryo-larvaire a été observée *in vitro*. Ces résultats suggèrent que les zones d'accumulation massive de structures perlicoles en plastique (opérationnelles et/ou abandonnées) pourraient représenter des points chauds de désorption de contaminants chimiques, impactant *P. margaritifera*, en contact étroit avec ces équipements, mais aussi le biote environnant. Dans l'ensemble, cette thèse démontre une menace associée aux MNP qui pèse sur l'huître perlière, la durabilité de son industrie et plus largement, sur l'écosystème lagonaire.

Mots clés : Microplastique | Lagons perlicoles | Toxicité | Huître perlière | Biologie | Additifs

Title: Microplastics contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia and their impacts in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*

Abstract: Plastic pollution of the marine environment is a global environmental, health and socio-economic issue. In French Polynesia, a specific source of plastic waste is associated with pearl-farming of which farming gears have been accumulating in the lagoons for more than 40 years. This plastic deposit is likely to degrade in micro- and nanoplastics (MNP, <5 mm), leading to an ubiquitous contamination at the global scale which is of great concern for risks to marine organisms and ecosystems. The aims of this thesis were to assess microplastics (MP) contamination in pearl-farming lagoons of French Polynesia and to investigate their effects on pearl oyster (*Pinctada margaritifera*). Results of sampling campaigns carried out in Ahe, Manihi and Takaroa atolls revealed the ubiquity of MP in the surface water, in the water column and the cultured pearl oysters' tissues. The concentrations recorded in surface waters (0.2 to 8.4 MP.m^{-3}) place these atolls at an unfavorable position compared to the microplastic concentrations measured at sea. Furthermore, the water column was found to be a highly contaminated compartment (14.0 to 716.2 MP.m^{-3}). The pearl oyster, a filter-feeding species reared between 4 and 6 meters deep, is then particularly exposed. Concentrations measured in the tissues of *P. margaritifera* (~ 0.3-21.5 MP.g^{-1} wet weight) are among the most contaminated values in marine bivalves. In order to assess the impact of MP in *P. margaritifera* biology and pearl quality, two *in vivo* experiments were carried out under controlled laboratory conditions: one involving polystyrene microbeads (standardized micro-PS) and the other involving MNP produced from pearl-farming gears collected *in situ* including a low level of exposure to consider more realistic scenario. Results indicated a significant impact of micro-PS and pearl-farming MNP on the energy metabolism of exposed individuals. This alteration resulted in decreased of assimilation efficiency resulting in a dose-dependent reduction in energy gain. This energetic disruption has led to gametogenesis alteration and modulation of genes expression involved in defense mechanisms. Furthermore, the pearl quality was impacted at the microstructure level of the pearl nacre deposition. A toxicological approach conducted on pearl-farming plastic gears demonstrated their chemical toxicity potential through a significant hazardous contaminants' desorption (*e.g.* phthalates) in seawater (*i.e.* leachates). *P. margaritifera* embryos were exposed to these leachates and an alteration of the embryo-larval development was observed *in vitro*. These results suggest that massive accumulation areas of pearl-farming gears (operational and/or discarded) could represent hotspots of chemical contaminants desorption, potentially harmful for *P. margaritifera* but also the surrounding biota. Overall, this thesis demonstrates a threat associated with MNP burden on the pearl oyster, the sustainability of pearl-farming industry and more broadly, on the lagoon ecosystem.

Keywords: Microplastic | Pearl-farming lagoons | Toxicity | Pearl oyster | Biology | Additives