



INnovative fishing Gear for Ocean



## Livrable T3.2.1

# RAPPORT TECHNIQUE : TESTS DE BIODÉGRADATION ET ÉCOTOXICITÉ



EUROPEAN UNION

**Interreg**   
France ( Channel  
Manche ) England  
European Regional Development Fund



## Table des matières

I.	CONTEXTE.....	4
II.	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	4
	a. Description des échantillons de l'étude .....	4
	b. Étude de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu marin .....	5
	i. Préparation des matériaux de l'essai .....	5
	ii. Milieu d'incubation : eau de mer naturelle.....	5
	iii. Méthode de suivi respirométrique .....	7
	iv. Évaluation des résultats : équation mathématique de lissage .....	8
	c. Étude de l'impact écotoxicologique : modes opératoires.....	8
	i. Préparation des échantillons soumis aux essais .....	9
	ii. Microalgue <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	9
	iii. Crustacé <i>Artemia salina</i> .....	13
	iv. Larve d'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> .....	16
III.	RÉSULTATS : ÉTUDE DE LA BIODÉGRADABILITÉ .....	17
	a. Paramètres physico-chimiques et biologiques.....	17
	b. Cinétique de biodégradabilité en environnement marin.....	18
IV.	RÉSULTATS : ÉTUDE ÉCOTOXICOLOGIQUE .....	19
	a. Microalgue <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	19
	i. Détermination de l'équation de corrélation Fluorescence-Densité cellulaire.....	19
	ii. Inhibition de croissance observée après exposition aux matériaux de l'étude .....	20
	b. Crustacé <i>Artemia salina</i> .....	21
	c. Larve d'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> .....	23
	i. Sensibilité vis-à-vis du toxique de référence.....	23
	ii. Résultats obtenus pour les échantillons vieilliss.....	25
V.	DISCUSSIONS & PERSPECTIVES.....	27

## TABLE DES FIGURES

FIGURE 1: NORMES TECHNIQUES ET NORMES DE SPECIFICATION ASSOCIEES A LA BIODEGRADABILITE EN ENVIRONNEMENT MARIN .....	5
FIGURE 2: SITE DE PRELEVEMENT DE L'EAU DE MER NATURELLE ET DES SEDIMENTS DANS LE CADRE DES ESSAIS DE BIODEGRADABILITE..	6
FIGURE 3: SYSTEME D'EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE MARINE .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
FIGURE 4: SYSTEME DE DENOMBREMENT PAR CELLULE DE MALASSEZ.....	11
FIGURE 5: EXEMPLE DE DONNEES DOSE-REPONSE GENEREE A L'AIDE DE LA MACRO REGTOX.....	13
FIGURE 6: SCHEMA SIMPLIFIE DE L'ESSAI D'EVALUATION DE LA TOXICITE SUR LE MODELE ARTEMIA SALINA .....	15
FIGURE 7: TAUX MAXIMUM DE BIODEGRADATION MESURES POUR LES ECHANTILLONS DE L'ETUDE APRES 1 AN D'INCUBATION	<b>ERREUR !</b>
	<b>SIGNET NON DEFINI.</b>
FIGURE 8: TAUX DE BIODEGRADATION OBSERVES POUR LES ECHANTILLONS RETENUS EN 2EME PHASE .....	18
FIGURE 9: TAUX DE BIODEGRADATION OBSERVES POUR LES MATERIAUX PBS-E, PBS-I ET PCL-3 .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
FIGURE 10: TAUX DE BIODEGRADATION OBSERVES POUR LES MATERIAUX IND-AH(V), IND-0190 ET IND-PCL-2 .....	<b>ERREUR ! SIGNET</b>
	<b>NON DEFINI.</b>
FIGURE 11: EQUATION DE CORRELATION ENTRE LA FLUORESCENCE ET LA DENSITE CELLULAIRE MICROALGALE .....	20
FIGURE 12: INHIBITION DE LA CROISSANCE ALGALE A 72H EN FONCTION DU MATERIAU TESTE A UNE CONCENTRATION DE 150 MG/L21	
FIGURE 13: COURBE DOSE-REPONSE DE L'EXPOSITION D'A. SALINA AU SULFATE DE CUIVRE APRES 48H.....	22
FIGURE 14: MORTALITE OBSERVEE CHEZ LES NAUPLII D'A. SALINA APRES 48H D'EXPOSITION AUX MILIEUX CONTAMINES PAR LES	
PARTICULES DES MATERIAUX TESTES .....	22
FIGURE 15 - TAUX DE NON-DEVELOPPEMENT LARVAIRE DANS LA GAMME DE CUIVRE .....	23
FIGURE 16 - TAUX DE NON-DEVELOPPEMENT ET DE MALFORMATION DANS LA GAMME DE CUIVRE .....	24
FIGURE 17 - TAUX DE NON-DEVELOPPEMENT EN FONCTION DE L'ECHANTILLON TESTE.....	25
FIGURE 18 - TAUX DE NON-DEVELOPPEMENT ET DE MALFORMATIONS EN FONCTION DE L'ECHANTILLON TESTE .....	26
FIGURE 19 - GRADIENT DE TOXICITE POUR LES NEUF ECHANTILLONS TESTES .....	26
FIGURE 20: DETTE TOXIQUE (CREDIT : RILLIG ET AL. 2021, ENV SCI TECHN).....	29
TABLEAU 1: PRESENTATION DES ECHANTILLONS DE L'ETUDE .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
TABLEAU 2: SOLUTIONS MERE NUTRITIVES .....	10
TABLEAU 3: COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EAU DE MER SYNTHETIQUE .....	10
TABLEAU 4: PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES.....	17
TABLEAU 5: CORRESPONDANCE DES CODIFICATIONS ECHANTILLONS REÇUS - ECHANTILLONS TESTES.....	19
TABLEAU 6: CRITERES DE VALIDITES DE L'ESSAI .....	21

## I. CONTEXTE

Les matériaux biodégradables peuvent être décomposés naturellement par des processus biologiques, tels que l'action d'organismes vivants ou de micro-organismes, en éléments simples et non toxiques. Ils offrent une alternative plus respectueuse de l'environnement aux matériaux traditionnels qui peuvent évoluer plusieurs siècles dans l'environnement sans se décomposer.

Ces caractéristiques particulières présentent ainsi un attrait particulier dans les enjeux actuels de préservation de l'environnement tels que la réduction des déchets plastiques, la préservation des ressources ou encore la protection des écosystèmes marins.

Si l'on considère le secteur de la pêche il devient intéressant de se tourner vers ces alternatives aux impacts environnementaux mieux maîtrisés. Les engins de pêche biodégradables présenteraient ainsi plusieurs enjeux en réduisant les déchets marins, limitant ainsi l'accumulation de débris flottants notamment, limitant également les phénomènes de pêche fantôme.

Cependant, des défis subsistent, notamment en termes de performance et de durabilité des engins, qui doivent être suffisamment résistants pour résister aux conditions marines et à l'activité de pêche. Les coûts et l'accessibilité des engins de pêche biodégradables peuvent également poser des problèmes, tout comme l'établissement de normes et de certifications appropriées pour garantir leur efficacité et leur biodégradabilité et l'évaluation de l'impact toxicologique selon l'échelle de temps prise en compte.

## II. MATÉRIELS & MÉTHODES

### a. Description des échantillons de l'étude

Un panel de 12 échantillons a été soumis à l'étude et à la suite de l'ensemble des essais réalisés (performance, caractérisation physico-chimiques...) sur les livrables en amont une sélection de trois formulations a été opérée : deux mono-filaments (filet fin) et un multi-filament (filet de catinage), décrit ci-dessous (Tableau 1).

Nom échantillon	Correspondance
INd_AC(M)	MONO_1_AC
INd_AH(V)	MONO_2_AH
INd-Y	MULTI_2

Tableau 1 : Correspondance dénomination des échantillons

b. Étude de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu marin

Il existe un certain nombre de normes qui sont spécifiques de la zone étudiée (Figure 1).

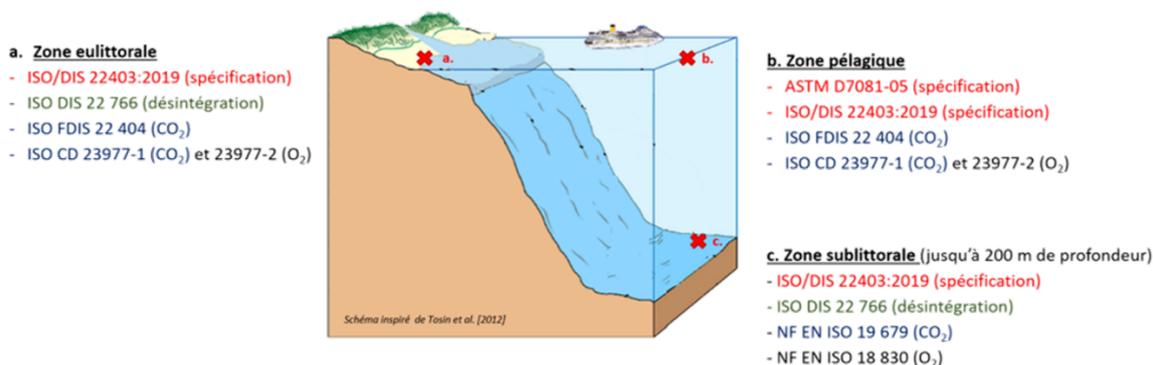


Figure 1: Normes techniques et normes de spécification associées à la biodégradabilité en environnement marin

La biodégradabilité est évaluée sur la base de la norme NF EN ISO 19679 :2017 Plastiques – Détermination de la biodégradation aérobie des matières plastiques non-flottantes à l’interface eau de mer/sédiments – Méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré. La méthodologie varie de la norme par l’utilisation du NaOH comme absorbeur de CO<sub>2</sub> en lieu et place du KOH. Les équations réactionnelles sont indiquées dans le § II.b.iii du présent document.

i. Préparation des matériaux de l’essai

Les matériaux testés ont été fournis sous forme de granulés de 2 à 3 mm. L’ensemble des granulés ont été broyés sous azote liquide (IK A10 Basic, Werke GmbH & Co, Germany)) afin de limiter l’impact de l’augmentation en température dans l’enceinte lors du broyage garantissant l’intégrité des propriétés des matériaux de l’étude. Le broyat obtenu est ensuite tamisé sur tamis de 200µm de vide de maille. La granulométrie exacte de la fraction tamisée n’est pas mesurée. Cette fraction est ensuite utilisée pour les essais de biodégradabilité.

Chaque échantillon de l’étude ainsi que la référence positive est soumis à une détermination de la quantité en carbone organique total par analyse élémentaire (Vario Cube, Elementar) qui permet de déterminer la quantité totale d’échantillon à soumettre à l’étude mais également de déterminer la quantité théorique maximale de CO<sub>2</sub> libéré par le matériau au cours du process.

ii. Milieu d’incubation : eau de mer naturelle

L’eau de mer naturelle servant aux expérimentations est prélevée sur le site côtier Le Perello, 56270 PLOEMEUR (coordonnées 47.69974136352539, -3.4431159496307373) (Figure 2)



Figure 2: Site de prélèvement de l'eau de mer naturelle et des sédiments dans le cadre des essais de biodégradabilité



L'environnement direct du site de prélèvement est exempt d'activité industrielle et la qualité de l'eau est en adéquation avec la réalisation des essais. L'eau et le sédiment prélevé sont directement acheminés au laboratoire pour la réalisation des essais. Afin d'éviter toute conservation les essais sont directement initiés et le contrôle de la charge en microorganismes réalisé a posteriori.

#### **Contrôle de la charge en microorganismes :**

La détermination de la concentration en microorganismes est réalisée par dépôt de 100µL de la solution d'eau de mer naturelle et étalement de dilutions successives sur une gélose nutritive (sur boîte de Petri). La gélose est préparée à l'aide de 37,5 g de milieu Marine Broth (Sigma-Merck, Marine Broth 2216) additivé de 1,5% en masse d'agar pour 1 L d'eau déionisée. La boîte de Petri est incubée à 20°C en enceinte thermostatée pendant 48h à 72h avant dénombrement des unités formant colonies

#### **Préparation de l'eau de mer naturelle avant incubation :**

Afin de compenser les déficits en éléments nécessaires au maintien de la bonne qualité du milieu, l'eau de mer naturelle est supplémentée avec 1 mM d'une solution de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) et 0,1 mM d'une solution de phosphate de potassium (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Les éléments phosphore et azote étant nécessaire au microorganismes il est impératif de ne pas atteindre des conditions limitantes en N et P.

#### **Inoculation de l'échantillon et incubation :**

Dans un flacon laveur de Durand (taré) d'une capacité de 250 mL, 30 grammes de sédiments sont déposés dans le fond puis 100 mL d'eau de mer naturelle amendée en phosphore et azote sont ajoutés. Un second flacon laveur est quant à lui rempli à l'aide de 30mL d'une solution de NaOH à 0,2N. Le système est ensuite connecté de sorte que l'ensemble forme un dispositif étanche avec une re-

circularisation de l'oxygène et une capture du CO<sub>2</sub> émis. Cette configuration est représentative des lots témoin de respiration qui correspondent à l'activité des microorganismes en l'absence de substance d'essai ou de substance de référence.

50 mg d'équivalent carbone pour chacun des échantillons sont ajoutés aux différents lots d'essai tandis que les lots témoin référence positive sont dopés de 123,15 mg de cellulose microcristalline Avicell. L'ensemble des pesées sont réalisées à l'aide d'une balance de précision 0,1 mg (Radwag Wagi Elektroniczne, Poland).

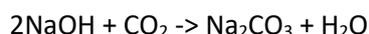
Le système de pompe à air est étanchéifié et la vérification s'effectue par dosage du CO<sub>2</sub> dans le système sur une durée de 15 jours précédant l'expérimentation. La quantité ne doit pas excéder la quantité naturellement retrouvée dans l'air rapportée à la quantité d'air présente dans le système soit environ 0,5L.

L'incubation est réalisée en bain-marie (Memmert GmbH, Allemagne) maintenu à une température de 20°C ± 2°C et la pompe à air est mise en marche 15min toutes les 2H pour assurer la recirculation de l'oxygène et forcer la capture du CO<sub>2</sub> dans la solution absorbante.

### iii. Méthode de suivi respirométrique

Un suivi effectué toutes les deux à trois semaines permet l'obtention d'un nombre de points de mesures suffisant pour le traçage de la cinétique. Durant toute la période d'incubation, les microorganismes vont dans la mesure du possible bio-assimiler le carbone présent dans l'échantillon soumis à l'étude et de le minéraliser produisant ainsi différents éléments dont le CO<sub>2</sub>. Le dosage du CO<sub>2</sub> émis entre deux mesures permet ainsi de remonter à la quantité de carbone bio-assimilée et donc biodégradée. Ce CO<sub>2</sub> est ensuite piégé dans le récipient contenant la solution absorbante (NaOH à 0,2N) selon les mécanismes réactionnels suivants :

Le CO<sub>2</sub> est piégé par la solution absorbante selon l'équation suivante



Ajout de 5 mL d'une solution de chlorure de baryum (BaCl<sub>2</sub>) à une concentration de 246 g/L



La solution absorbante étant présente en excès, il est possible d'en doser l'excédent par l'ajout d'acide chlorhydrique à 0,1N et en affichant le virage colorimétrique (pH=7) à l'aide d'un indicateur coloré, la thymolphtaléine (passage d'une solution bleue à une solution blanche lorsque la zone de virage est atteinte)



Le volume d'HCl versé ainsi déterminé permet de remonter à la quantité de NaOH en excès et la quantité de NaOH ayant réagi avec le CO<sub>2</sub>.

Le pourcentage de carbone dans l'échantillon étant connu il est possible de déterminer la quantité théorique maximale de CO<sub>2</sub> libéré (ThCO<sub>2</sub>) par l'échantillon dans le cas d'une minéralisation complète. Le pourcentage de biodégradation est donc calculé comme suit :

$$\% \text{ biodégradation} = \frac{\text{mg de CO}_2 \text{ (flacon d'essai)} - \text{mg CO}_2 \text{ (témoin respiration)}}{\text{ThCO}_2} \times 100$$

A chaque mesure les flacons sont laissés ouverts 1 minute avec les pompes en fonctionnement afin de forcer le renouvellement en oxygène dans le système. Cette ouverture implique un apport en CO<sub>2</sub> contenu dans l'air renouvelé qui est pris en compte par soustraction de la masse mesurée de CO<sub>2</sub> libérée par les lots témoins.

Chaque flacon est également pesé et comparé à sa tare afin de quantifier une éventuelle évaporation du milieu d'incubation. Dans le cas d'une évaporation avérée, un complément en eau déionisée est ajouté au flacon afin de préserver la salinité initiale de l'eau de mer naturelle utilisée dans l'étude.

#### iv. Évaluation des résultats : équation mathématique de lissage

Les résultats obtenus doivent exprimer le taux de biodégradation en fonction du temps d'incubation. La cinétique ainsi comparée et comparée à la cinétique obtenue pour le matériau de référence (cellulose microcristalline AVICELL, Grosseron).

Les données sont lissées à l'aide du logiciel DataFit9 (Oakdale Engineering). Les jeux de données sont intégrés en entrée et selon le type de graphe brut obtenu lors du suivi respirométrique puis lissé mathématiquement à l'aide de l'équation de Hill.

Il n'est pas possible d'extrapoler les données obtenues et il est important de ne considérer que la zone temporelle couverte par les mesures.

#### c. Étude de l'impact écotoxicologique : modes opératoires

Les essais sont réalisés sur une sélection de trois formulations : MONO 1 AC PE, MONO 2 AH VF, MULTI 1 BOBINE 2. Chacune de ces formulations ont été soumises à une étape de vieillissement en air ou en eau de mer.

Les normes utilisées dans l'évaluation toxicologique de substances sur des organismes du milieu marin sont associées à des molécules solubles. Dans le cadre des essais menés les particules ne sont pas solubles et l'essai nécessite un ajustement. Une possibilité consiste à évaluer la toxicité de l'eau de mer issue des essais de biodégradabilité aérobie ultime à l'interface eau de mer – sédiments. Cette condition n'étant pas réalisable compte tenu du nombre d'échantillons testés dans l'étape de biodégradation et les volumes mis en jeu (100mL par réplicat) comparés aux volumes nécessaires à l'ensemble des essais toxicologiques (>1L), il a été décidé de réaliser les essais sur la base du matériau vieilli en enceinte climatique (cf livrable T3.1.2 Rapport Technique sur l'étude du Vieillissement des nouveaux engins de pêche) et de travailler à l'homogénéisation des particules avant essai et tester l'eau de mer de vieillissement des particules.

i. Préparation des échantillons soumis aux essais

Les échantillons vieillis selon différentes conditions (cf livrable T3.1.2), ont été fournis à IRMA sous la forme de microparticules-macroparticules. Les échantillons de l'étude sont mis en suspension dans un volume d'eau de mer artificielle enrichie en nutriments de façon à obtenir une concentration de 150 mg de particules/L d'eau de mer. Les solutions sont maintenues sous agitation afin d'optimiser l'homogénéité dans le récipient des particules insolubles.

ii. Microalgue *Phaeodactylum tricornutum*

*Phaeodactylum tricornutum* (classe : *Bacillariophyceae*; ordre : *naviculales*; famille : *Phaeodactylaceae*) est une diatomée marine utilisée en écotoxicologie comme modèle dans l'évaluation de la qualité de l'eau. Les essais sont réalisés sur la base de la norme internationale ISO 10253:2016 Qualité de l'eau : Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum*. La souche *P. tricornutum* utilisée lors des essais est issue de la collection de culture de l'Université de Caen Normandie (AlgoBank-Caen) sous le numéro de souche AC590-CCAPP1052/1. Lors de sa réception, la microalgue est conservée en milieu F/2 qui est un milieu nutritif spécifique et équivalent à la solution de préparation décrite dans la norme ISO 10253:2016 (§5.3, 5.4, 7.1).

L'essai consiste à exposer une culture de la microalgue *P. tricornutum* aux solutions de l'étude et à enregistrer les différences de croissance entre un lot témoin et les lots de l'essai et de valider la sensibilité de la diatomée par le biais d'une substance toxique de référence.

L'essai se présente en 6 étapes :

**Préparation du milieu de croissance :**

Une préculture est préparée 2 à 4 jours avant le début de l'essai, permettant de se situer dans la phase exponentielle de croissance. Le milieu de croissance correspond à une eau de mer artificielle (Tableau 3) enrichie à l'aide de solutions nutritives (Tableau 2) et est constitué comme suit : 15 mL de solution mère nutritive 1, 0,5 mL de solution mère nutritive 2 et 1 mL de solution mère nutritive 3, puis complété à 1L en fiole jaugée à l'aide de la solution d'eau de mer artificielle. Le pH de la solution est ajusté à  $8,0 \pm 0,2$  à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.

NB : les solutions sont filtrées sur membrane 0,22 µm pour garantir une stérilité de l'expérimentation.

Nutriment	Concentration dans la solution mère	Concentration finale dans la solution d'essai
<b>Solution mère 1</b>		
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	48 mg/L	149 µg/L (Fe)
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	144 mg/L	605 µg/L (Mn)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	45 mg/L	150 µg/L (Zn)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,157 mg/L	0,6 µg/L (Cu)
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,404 mg/L	1,5 µg/L (Co)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 140 mg/L	3,0 mg/L (B)
Na <sub>2</sub> EDTA	1 000 mg/L	15,0 mg/L
<b>Solution mère 2</b>		
Chlorhydrate de thiamine	50 mg/L	25 µg/L
Biotine	0,01 mg/L	0,0005 µg/L
Vitamine B12	0,1 mg/L	0,05 µg/L
<b>Solution mère 3</b>		
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/L	0,438 mg/L (P)
NaNO <sub>3</sub>	50 g/L	8,24 mg/L (N)
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	14,9 g/L	1,97 mg/L (Si)

Tableau 2: Solutions mère nutritives

Sel	Concentration des sels dans l'eau de mer synthétique g/L
NaCl	22
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	9,7
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydre)	3,7
CaCl <sub>2</sub> (anhydre)	1,0
KCl	0,65
NaHCO <sub>3</sub>	0,20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023

Tableau 3: Composition chimique de l'eau de mer synthétique

### Préparation de la préculture et de l'inoculum :

La préculture est préparée par ajout d'un volume de la culture mère suffisant pour obtenir une densité cellulaire comprise entre  $2 \cdot 10^3$  cellules/mL et  $10^4$  cellules/mL. Afin de respecter les critères de validité indiqués plus loin, il est nécessaire de partir d'une densité de  $10^4$  cellules/mL sous peine de ne pas atteindre un taux de croissance spécifique moyen supérieur à  $0,9 \text{ jour}^{-1}$  sur la durée de l'essai.

La préculture est préparée 3 à 4 jours avant le début de l'expérimentation et est incubée dans les mêmes conditions que celles de l'essai.

### Détermination de la densité cellulaire :

De nombreuses manières de dénombrer le nombre de cellules dans les différentes solutions (précultures, culture mère, solutions de l'essai) sont possibles. Dans le cadre de l'Interreg INdIGO, il a été choisi de procéder en deux temps : premièrement en dénombrant sur cellule de Malassez (Figure 3) puis en établissant une correspondance par mesure de la fluorescence émise par *P. tricornutum*. La densité microalgale est suivie par mesure de la fluorescence de la chlorophylle a (chl<sub>a</sub>) (λ<sub>excitation</sub>=633 nm, λ<sub>émission</sub>=638- 720 nm) à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

La relation fluorescence = f(concentration) peut ainsi être déterminée et permet une mesure de la densité microalgale plus rapide lors des essais.

Le dénombrement sur cellule de Malassez s'effectue sur 10 zones quadrillées verticalement et horizontalement, le dénombrement est ramené à un nombre de cellule/zone puis rapporté à un volume de travail calculé à partir des données métriques de la cellule soit un calcul de la densité microalgale exprimée en cellules / mL déterminé comme suit :

$$\text{densité cellulaire} = \frac{\Sigma \text{cellules pour } X \text{ zones}}{X \text{ zones}} \times 10^5$$

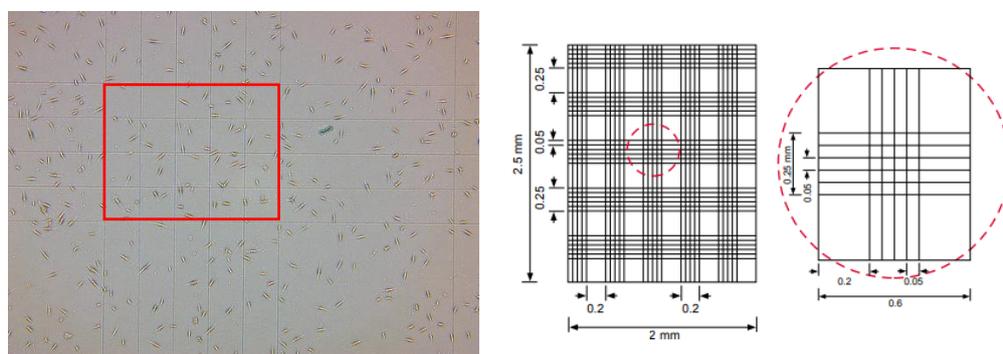


Figure 3: Système de dénombrement par cellule de Malassez

### Concentrations de l'essai :

Un pré-essai sur une concentration de 150 mg de particules / L d'eau de mer artificielle enrichie en nutriments (comme décrit dans le § *Préparation du milieu de croissance*) est réalisé. Si une réponse toxique est enregistrée lors de cet essai il est nécessaire de procéder à une exposition des microalgues à une série de 5 concentrations dans une gamme géométrique de raison inférieure ou égale à 3,2 (par exemple 1,0 mg/L, 1,8 mg/L, 3,2 mg/L, 5,6 mg/L ...). La gamme ainsi choisie doit inclure au moins une réponse inhibitrice au-dessus et en-dessous du paramètre EC<sub>50</sub> (e.g. une réponse au-dessus de l'EC<sub>90</sub> et une réponse en-dessous de l'EC<sub>10</sub>).

### Incubation :

L'incubation est réalisée en enceinte phytotronique HELIOS 600 (Cryotek, France) dont la température est maintenue à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , et suit un cycle jour-nuit de 16H/8H de luminosité égale à  $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La durée totale d'incubation est de  $72\text{H} \pm 2\text{H}$ .

### Evaluation du pourcentage d'inhibition :

Le pourcentage d'inhibition de croissance représente la différence du taux de croissance spécifique moyen des lots témoin par rapport à celui des lots d'essai et ce rapporté à la durée de l'essai.

Le taux de croissance spécifique moyen,  $\mu$ , est calculé comme suit :

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0}$$

avec :

$t_0$  l'instant du début de l'essai

$t_L$  l'instant de fin de l'essai (dernier mesurage)

$N_0$  la densité cellulaire à  $t_0$

$N_L$  la densité cellulaire à la fin de l'essai

Une fois calculé le taux de croissance spécifique moyen pour chacun des récipients de l'essai, le pourcentage d'inhibition,  $I_{\mu i}$ , dans chaque flacon est déterminé selon la méthode de calcul ci-après :

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_C - \mu_i}{\bar{\mu}_C} \times 100$$

avec :

- $\mu_i$  : le taux de croissance pour le flacon d'essai  $i$
- $\bar{\mu}_C$  : le taux de croissance moyen pour les lots témoins

Les données brutes ainsi obtenues sont renseignées dans un tableur Excel RegTox (Université de Lyon 1) possédant une macro développée pour les modèles dose-réponse. L'exécution de la macro génère le graphique  $I_{\mu i} = f(\text{concentration})$  et indique sur ce dernier les paramètres  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  et  $EC_{90}$  lorsque cela est possible (exemple de données générées par RegTox sur la Figure 4)

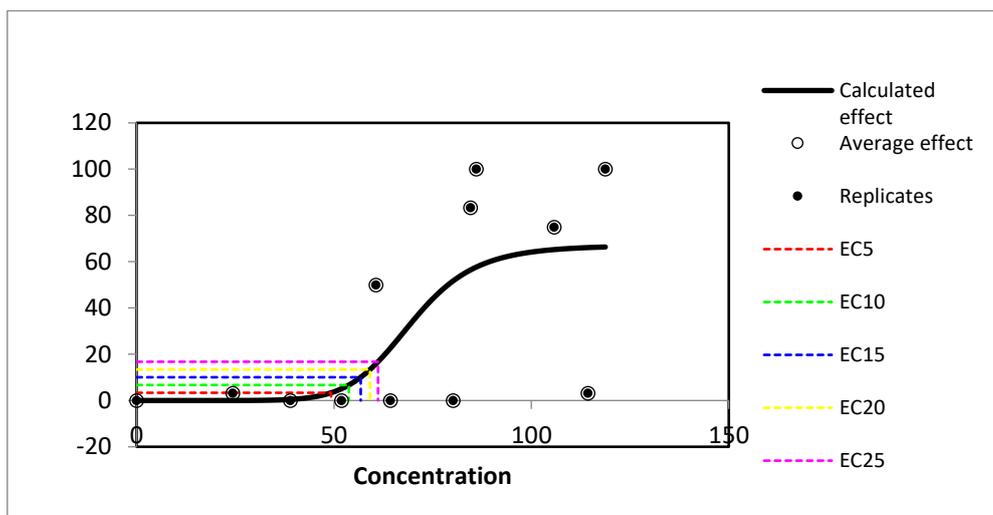


Figure 4: Exemple de données Dose-Réponse générée à l'aide de la macro RegTox

### Validité de l'essai :

L'essai est considéré valide si les conditions suivantes sont remplies pour les lots témoins de croissance :

- La densité cellulaire moyenne a augmenté d'un facteur 16 en 72H (soit un taux de croissance spécifique moyen de 0,9 d<sup>-1</sup>)
- Le coefficient de variation des taux spécifiques de croissance est inférieur à 7%
- La variation du pH est inférieure ou égale à 1 unité

### iii. Crustacé *Artemia salina*

*Artemia salina* (classe : *branchiopodes*, ordre : *anostracés*, famille : *artemiidae*) est un organisme modèle en écotoxicologie (Sorgeloos et al 1978). Les essais sont réalisés selon une adaptation de la norme FD ISO 14669 :2003-08 : Détermination de la toxicité létale aiguë vis-à-vis des copépodes marins. La norme prévoit les essais sur un organisme modèle *Acartia tonsa* qui nécessitent un maintien des populations générations après générations et en fait un modèle d'étude plus difficile à mettre en œuvre dans le cadre d'évaluations toxicologiques. Les organismes de l'essai sont présentés sous leur forme de cystes déshydratés (fournisseur Philanima, fabricant JBL) dont le taux d'éclosion, qui doit être supérieur à 80%, est déterminé avant le début de chaque série d'expérimentations afin de vérifier la qualité du matériel biologique.

L'essai se présente en trois étapes : éclosion, exposition, évaluation.

### Eclosion des cystes :

Les cystes d'*A. salina* déshydratés sont réhydratés par immersion dans une eau de mer artificielle produite à partir d'un mélange préconstitué (InstantOcean, Aquarium Systems) et à une salinité égale à 33 PSU. L'oxygénation du milieu est assurée par une mini pompe reliée à un capillaire plongeant dans

le récipient de préculture (bécher d'une capacité d'1L) et assurant ainsi une homogénéisation du milieu. L'éclosion des cystes s'effectue dans un délai de 72H et dans les conditions physico-chimiques suivantes : température égale à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH égal à  $8,0 \pm 0,3$ , concentration en oxygène dissous supérieure ou égale à 80%, salinité égale à  $33 \pm 3$  PSU, cycle jour/nuit de 16H/8H). L'éclosion ayant lieu le plus souvent à partir de 48H dans les conditions spécifiées, les essais sont menés sur des larves ou nauplii au stade Instar I et donc la différence d'âge entre les plus vieilles et les plus jeunes nauplii n'excède pas 6H.

### **Exposition des cystes :**

Les expositions se font dans des plaques multipuits de 12 puits (Cellstar® Greiner Bio-one, Cellules en suspension, capacité de 4mL par puits). La première étape se fait par exposition des solutions d'essais non diluées. Chaque solution d'essai testée, y compris le lot témoin, est inoculée sur une plaque multipuits, soit 12 puits au total et environ 60 à 70 individus exposés.

Le lot témoin représente l'exposition des nauplii à une eau de mer artificielle préparée selon la norme ISO 10253 :2006 §5.3 Eau de mer (Tableau 3). Il s'agit du milieu de référence pour l'évaluation de la mortalité et de la morbidité présenter dans l'étape 3 « Evaluation de la mortalité et du comportement ».

Les lots d'essais représentent les populations d'*A. salina* exposées aux solutions d'essais non diluées mais préparées dans une eau de mer synthétique de référence équivalente à celle utilisée pour les lots témoins.

Un lot toxique de référence, le sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), est également ajouté à l'étude afin de déterminer la sensibilité des nauplii à une substance pour laquelle la concentration entraînant une mortalité de 50% de la population exposée ( $\text{CL}_{50}$ ) est déterminée au préalable, comparée à la littérature puis utilisée lors des essais ultérieurs.

Chacun des puits de l'essai doit contenir de 5 à 7 nauplii (en respectant un volume minimal par individu supérieur ou égal à 0,5mL/nauplii. Le volume de travail dans les puits étant de 4mL, il est impératif de ne pas excéder un total de 8 individus par puits.

NB : l'observation par dénombrement des individus morts/vivants/morbides est rendue difficile lorsque le nombre de nauplii excède 7 individus.

L'exposition se fait par ajout d'un volume de 100  $\mu\text{L}$  contenant le nombre requis d'*A. salina* dans chaque puits contenant 4 mL d'eau de mer synthétique (puits lot témoin), 4 mL de la solution d'essai (puits lots d'essai) et 4 mL de solution toxique de référence  $\text{CuSO}_4$  aux différentes concentrations évaluées.

Le prélèvement des nauplii dans le milieu de culture initial est assuré à l'aide d'une pipette dont le diamètre de l'embout est compatible avec la taille du nauplius afin de ne pas l'endommager ce qui influera sur les résultats obtenus. Le volume de 100  $\mu\text{L}$  prélevé porte le volume final dans chacun des puits à 4,1 mL induisant une dilution de 0,025. Dans le cas des lots toxique de référence la concentration réelle d'exposition et recalculée à l'aide de ce facteur de dilution.

Le temps d'exposition est de 48H, offrant ainsi une période où les larves utilisent leurs réserves vitellines comme apport énergétique limitant la nécessité de les nourrir. Les plaques sont maintenues dans une enceinte thermostatée à  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  avec une photopériode jour/nuit de 16H/8H.

Une représentation simplifiée de l'essai est présentée en Figure 5.

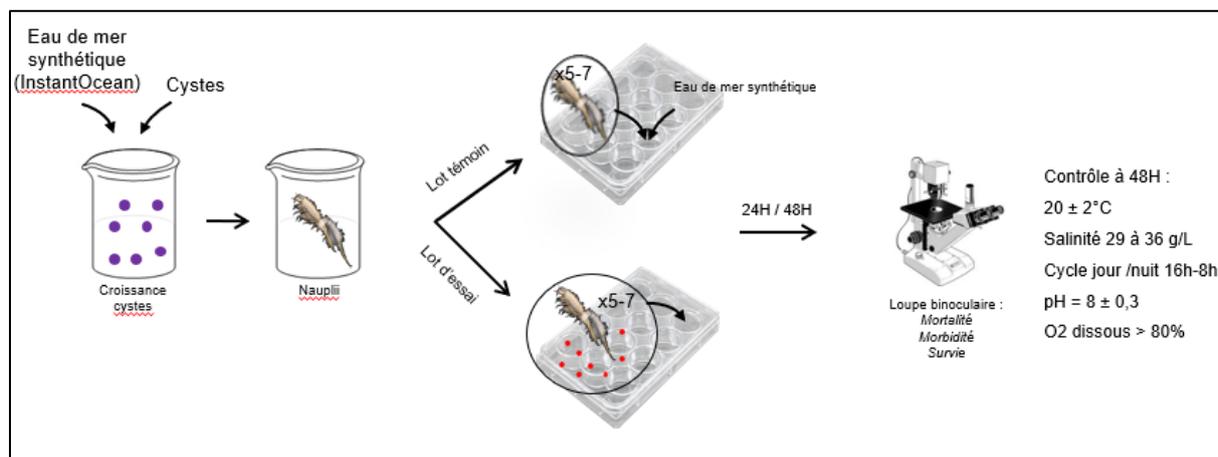


Figure 5: Schéma simplifié de l'essai d'évaluation de la toxicité sur le modèle *Artemia salina*

### Evaluation de la mortalité et du comportement :

Une observation à la loupe binoculaire est réalisée après 24H et 48H d'exposition et les comportements des larves reportés comme suit :

- **Sain** : le nauplius a un comportement normal
- **Morbide** : le nauplius a comportement anormal allant à des capacités de nage réduite à un état moribond
- **Mort** : absence de mouvement du nauplius pendant au moins 20 secondes

Afin de préserver une qualité optimale du milieu d'incubation et réduire le risque de déchets métaboliques, les nauplii comptabilisés morts après 24H sont retirés.

Le taux de mortalité pour chaque lot d'essai est déterminé par le rapport du nombre d'individus morts sur la somme de tous les états observés (vivants, morts, morbides).

De la même manière que pour les essais sur la microalgue *P. tricornutum* les données brutes sont saisies sous RegTox afin d'obtenir la modélisation dose-réponse et si réalisable l'obtention des paramètres EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> et EC<sub>90</sub>.

### Validité de l'essai :

L'essai est considéré valide lorsque le taux de mortalité dans le lot témoin est inférieur à 10%. Dans le cas contraire l'essai doit être écarté et une nouvelle itération réalisée.

Les paramètres pH, oxygène dissous et salinité sont contrôlés au début et à la fin de l'essai.

#### iv. Larve d'oursin *Paracentrotus lividus*

L'utilisation d'oursins présente un intérêt certain en écotoxicologie, du fait de leur sensibilité importante dans les premiers stades de leur développement. De ce fait, et grâce à la maîtrise de l'échiniculture permettant d'obtenir des géniteurs matures tout au long de l'année, les larves d'oursins sont utilisées selon une méthode standardisée (S. Pétinay et al., C. R. Biologies 332 (2009)) afin d'évaluer la qualité d'une eau de mer, ou de connaître l'impact de certains produits sur la survie et le développement de ces larves.

#### **Matériel biologique :**

Les larves d'oursins *Paracentrotus Lividus* utilisées sont issues de géniteurs élevés au SMEL (Synergie Mer et Littoral) à Blainville-sur-Mer (50, Manche). Ces derniers sont élevés en circuit semi-fermé dans des bassins dont l'eau est thermorégulée à 18°C. Ils sont alimentés avec *Laminaria Digitata* jusqu'à atteindre une taille suffisante d'environ 40mm, soit environ deux ans. Par la suite, les géniteurs sont soumis à un cycle de maturation de quatre mois environ se déroulant comme suit :

- Une phase de jeûne à 18°C avec une photopériode de type jour court (8H/16H), ce qui permet de vider les gonades par amaigrissement et ainsi homogénéiser le lot de géniteurs.
- Une phase de réalimentation pendant un mois avec du maïs et des laminaires. En parallèle la température de l'eau est progressivement diminuée jusqu'à 8°C.
- Cette température est maintenue pendant un mois, et les géniteurs sont alimentés avec *Laminaria Digitata*. En parallèle la photopériode est progressivement remontée sur un type jour long (16H/8H).
- Enfin, la température de l'eau est progressivement remontée d'1°C toutes les 48H, jusqu'à atteindre 18°C. Ces conditions sont maintenues pendant un mois.
- Chaque jour, les fèces sont retirées et l'eau est renouvelée de 50%.

L'émission des gamètes est déclenchée par injection de chlorure de potassium (KCl) à raison de 0,5 mL dans la membrane périorale, l'injection pouvant être répétée au maximum trois fois. Les gamètes sont émis dans de l'eau de mer reconstituée, et la fécondation s'effectue par ajout de sperme dans l'eau contenant les ovocytes. Une observation au microscope des ovocytes fécondés (100µL sur une lame) permet de s'assurer de la réussite de la ponte. Pour cela, le taux de fécondation doit être supérieur à 95%. Pour l'expérimentation, environ 300 ovocytes fécondés sont disposés dans chaque échantillon de 5mL à tester.

#### **Méthode d'observation :**

Les échantillons sont laissés pendant 72H dans une pièce à 18°C pour que les larves se développent jusqu'au stade pluteus. Elles ne sont pas alimentées pour limiter les biais liés à l'apport d'éléments extérieurs.

A l'issue de cette période d'incubation, les larves sont fixées au formaldéhyde (200µL pour 5mL, soit une concentration finale de 0,75%) afin de stopper leur développement.

Sur cent larves observées par échantillon, sont évalués :

- Le taux de larves non-développées (œuf fécondé, blastula, gastrula).
- Le taux de malformation (au stade échinopluteus).

Sur quinze larves observées par échantillon, sont mesurées :

- Les longueurs de spicules ( $\pm IC_{95}$ )

Les séries d'échantillons sont validées par un contrôle négatif, ici une eau de mer (EDM) prélevée au large, sur l'archipel des îles Chausey, effectuée en quintupla, et un contrôle positif au cuivre (10 $\mu$ gCu/L; 30 $\mu$ gCu/L; 50 $\mu$ gCu/L; 70 $\mu$ gCu/L; 90 $\mu$ gCu/L).

Les mesures sont réalisées au microscope (x100), associé à un logiciel permettant l'acquisition d'images automatiques (Zen).

#### **Méthode d'analyse statistique :**

Les moyennes des taux de non-développement (%), de malformation (%) et de longueurs des spicules ( $\mu$ m) sont calculées, ainsi que les écart-types et les intervalles de confiance ( $IC_{95}$ ). Ces moyennes, selon les concentrations, permettent ensuite de déterminer la concentration létale médiane ( $CL_{50}$ ) à 24H et à 72H, soit la concentration d'une substance qui cause 50% de mortalité dans la population testée à 24H et à 72H d'exposition. Ici, il sera question de la concentration du produit commercial dans l'eau de mer utilisée. Afin de déterminer les différences significatives présentes entre les biocides testés, les taux de non-développement, de malformation et les longueurs des spicules sont analysés via une ANOVA et un test a posteriori (test de Student-Newman-Keuls,  $\alpha=0,05$ ), en utilisant le logiciel StatView.

#### **Validité du contrôle positif au cuivre :**

Une validation de la sensibilité des larves est réalisée par exposition au cuivre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) selon une gamme de concentration en accord avec la méthodologie présentée dans la littérature (S. Pétinay et al., (2009), p.5). Les concentrations sont exprimées en équivalent  $Cu^{2+}$  par unité de volume (concentration en  $\mu g_{Cu^{2+}}/L_{EDM}$ )

### III. RÉSULTATS : ÉTUDE DE LA BIODÉGRADABILITÉ

#### a. Paramètres physico-chimiques et biologiques

Le pH, la salinité et la température de l'eau de mer prélevée sont reportés dans le Tableau 4 pour les lots témoins.

Paramètres	Début de l'essai	Fin de l'essai
pH (mesurée au laboratoire)	8,09	7,99
Température (mesurée au laboratoire)	13,6*	21,5
Salinité (mesurée au laboratoire)	32,1	32,6
Densité microorganismes (cultivables)	3,2.10 <sup>3</sup>	NC

Tableau 4: Paramètres physico-chimiques et biologiques

(\*) température de l'eau de mer naturelle après prélèvement et avant stabilisation dans le bain-marie thermostaté.

Les mesures étant encore en cours pour une partie des échantillons, la mesure effectuée en fin d'essai correspond à la mesure réalisée au mois de mars 2023 sur le lot témoin. On note une légère acidification du milieu témoin à la fin de l'expérimentation.

b. Cinétique de biodégradabilité en environnement marin

Parmi les matériaux testés, trois ont été retenus sur la base de multiples critères (biodégradabilité, propriétés physico-chimiques, propriétés mécaniques, durabilité...) : INd\_AH(V), INd\_Y et INd\_AC(M). Les cinétiques de biodégradation sont présentées Figure 6. Les échantillons AC(M) et AH(V) voient leur biodégradation débuter après un temps d’immersion respectivement de 2 et 3 mois, en comparaison de la cellulose pour laquelle la biodégradation débute très rapidement. AC(M) atteint un plateau de biodégradation complète ( $\geq 100\%$ ) après 6 mois d’immersion tandis qu’AH(V) montre un plateau à 30% environ après 5 mois d’immersion. Le plateau se poursuit sur la durée de l’expérimentation. L’échantillon INd\_Y montre une biodégradabilité constante sur une durée de 6 mois avant l’apparition d’une diminution du taux qui pourrait se traduire par une forme d’écotoxicité. Il est nécessaire de confronter cette observation avec l’étude toxicologique car différents phénomènes peuvent expliquer ce comportement, notamment un défaut du boîtier électrique alimentant les pompes responsables de l’oxygénation du milieu, ou un défaut au niveau des pompes elles-mêmes. Le dispositif n’étant relié à aucun data logger il n’est pas possible d’apporter d’éléments de réponse sur ce type de défauts.

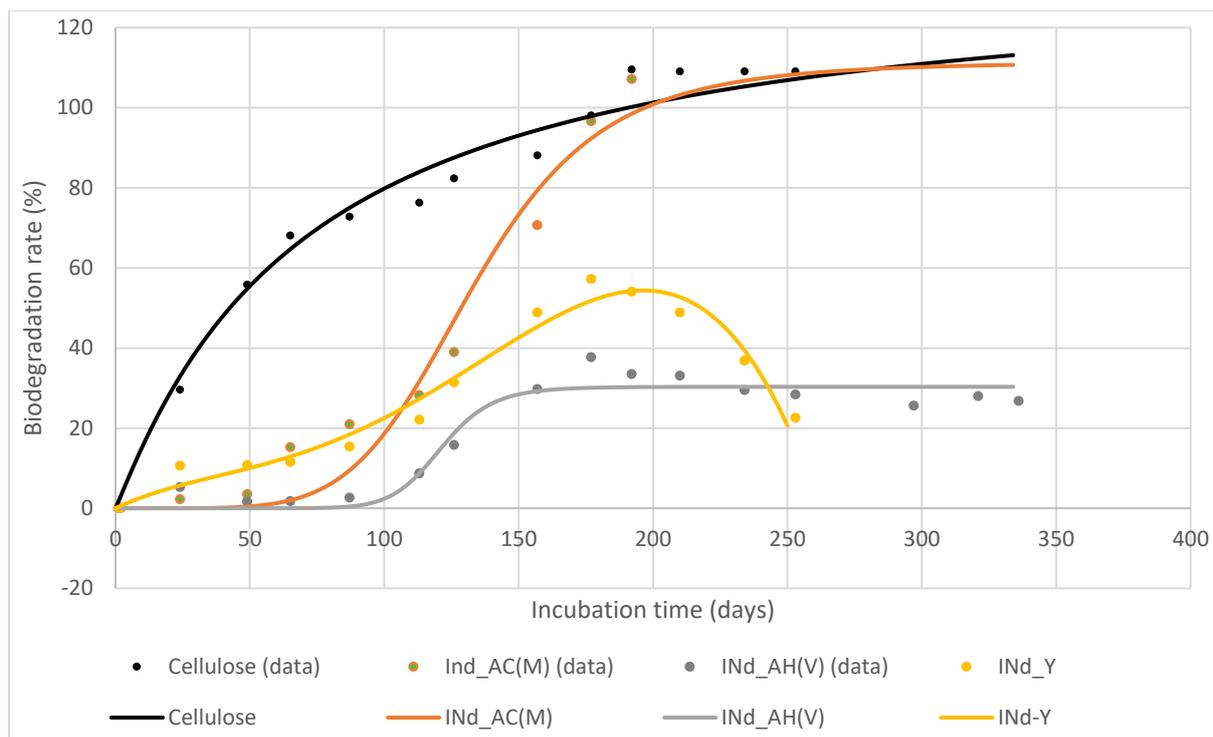


Figure 6: Taux de biodégradation observés pour les échantillons retenus en 2ème phase

#### IV. RÉSULTATS : ÉTUDE ÉCOTOXICOLOGIQUE

Dans le cadre des essais toxicologiques sur les modèles *P. tricornutum* et *A. salina*, les échantillons ont été renommés comme suit (Tableau 5) :

CODIFICATION ECHANTILLON	CODIFICATION ESSAI	MILIEU
Mono 1 AC PE Powder aged in air	MONO AC	Air
Mono 1 AC PE Powder aged in seawater		Seawater
Mono 1 AC PE Powder control		Control
Mono 2 AH VF Powder aged in air	MONO AH	Air
Mono 2 AH VF Powder aged in seawater		Seawater
Mono 2 AH VF (PE x1.5) control		Control
Multi bobine 2 aged in air	MULTI	Air
Multi bobine 2 aged seawater		Seawater
Multi bobine 2 control		Control

Tableau 5: Correspondance des codifications échantillons reçus - échantillons testés

##### a. Microalgue *Phaeodactylum tricornutum*

##### i. Détermination de l'équation de corrélation Fluorescence-Densité cellulaire

Les dilutions successives issues d'un aliquot de la culture mère permettent de relier les mesures de fluorescence aux dénombrements effectués sur cellule de comptage (type Malassez). La droite affine passant par 0 d'équation  $y = 119,32 x$  (Figure 7) montre une excellente corrélation avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,9991$ . L'intérêt d'établir une telle corrélation réside dans la rapidité de lecture des densités cellulaires avec contrôle aléatoire sur cellule de comptage pour confirmer la validité des mesures obtenues par fluorescence.

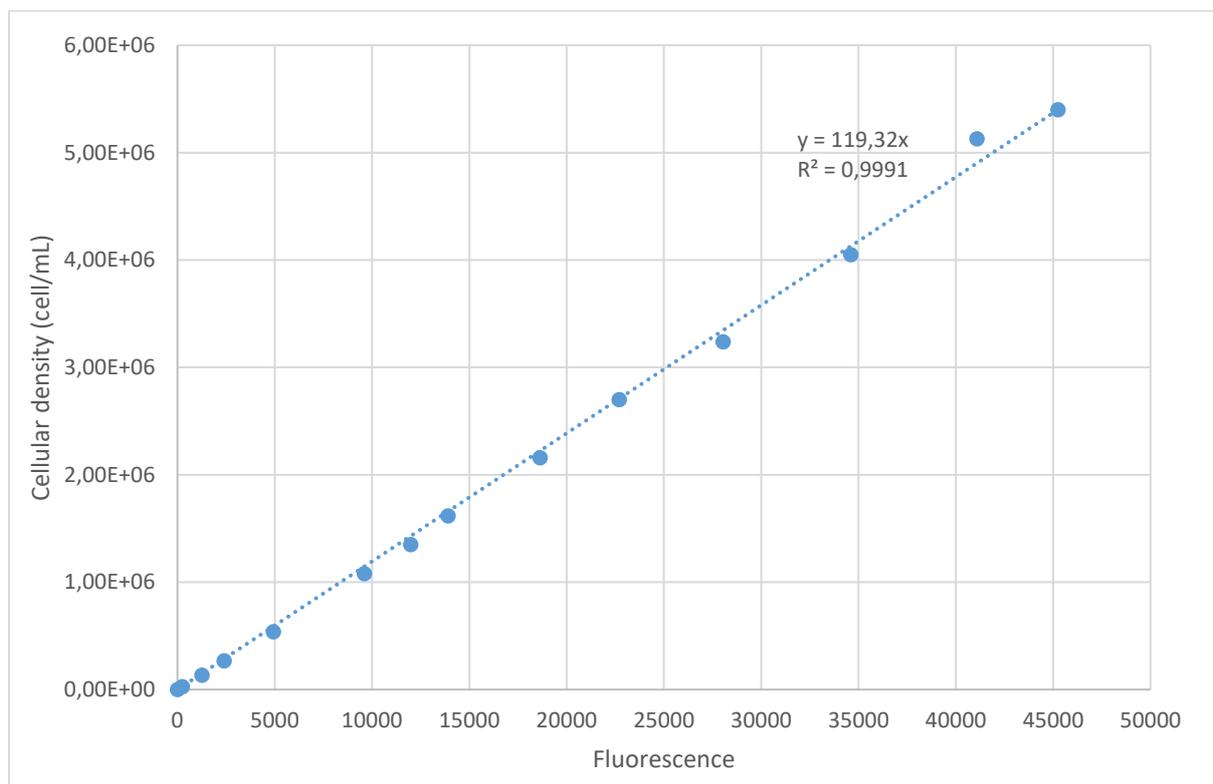


Figure 7: Equation de corrélation entre la fluorescence et la densité cellulaire microalgale

## ii. Inhibition de croissance observée après exposition aux matériaux de l'étude

La norme ISO 10253 : 2006 Essai d'inhibition de la croissance des algues marines, indique une  $CI_{50}$  (concentration entraînant une inhibition de 50% de la croissance algale) pour le toxique de référence  $K_2Cr_2O_7$  de  $20,1 \pm 5,3$  mg/L avec un coefficient de variation égal à 26%. La concentration en  $K_2Cr_2O_7$  dans l'essai a été choisie selon ces données et fixée à 20 mg/L. Il apparaît dans la Figure 8 que l'exposition de *P. tricornutum* au dichromate de potassium entraîne une réponse inhibitrice moyenne comprise entre 45% et 65% validant ainsi la sensibilité du modèle dans le cadre de l'essai.

L'ensemble des réponses inhibitrices enregistrées pour les matériaux contrôle et les deux conditions de vieillissement montrent une toxicité inférieure à la  $CI_{10}$  pour une concentration d'exposition d'environ 150 mg/L. Dans certains cas on enregistre une réponse favorisant la croissance algale (MONO\_AC\_Air, MONO\_AC\_Seawater, et MULTI\_Control et MULTI\_Seawater).

La réalisation d'un test t de Student sur l'ensemble des données montre d'une part :

- Une inhibition de croissance significativement différente vis-à-vis du lot témoin de croissance (indiqué par \* sur la figure Figure 8)
- Une différence significative de l'inhibition de croissance des matériaux vieillis vis-à-vis de leur contrôle (indiqué par \*\* sur la Figure 8)

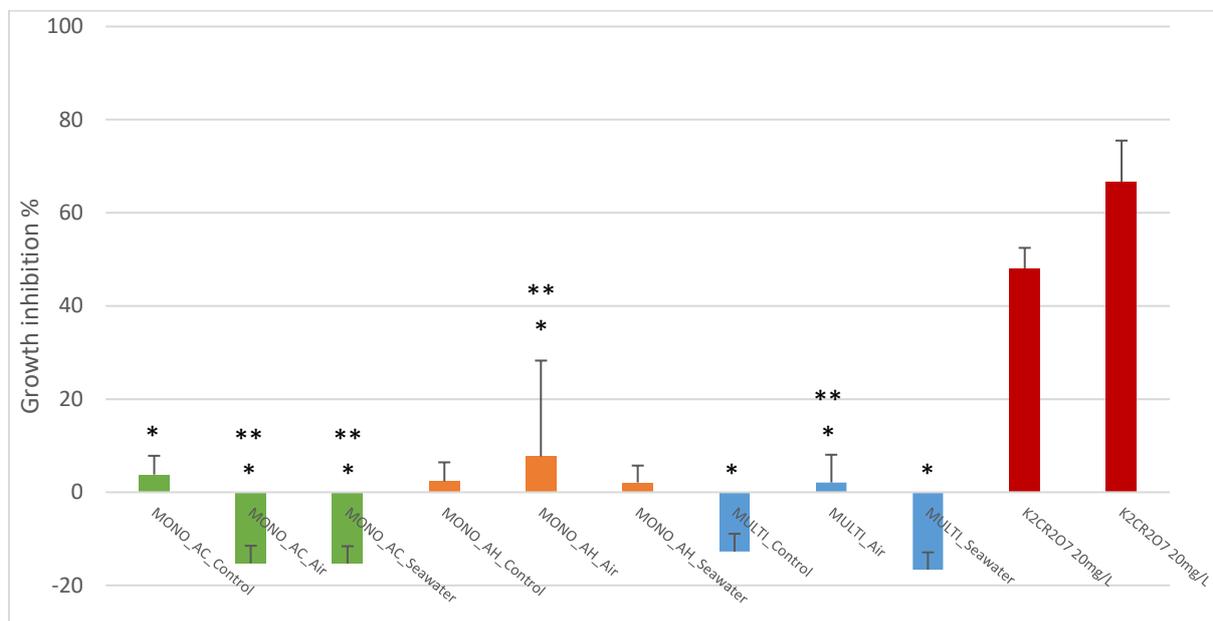


Figure 8: Inhibition de la croissance algale à 72H en fonction du matériau testé à une concentration de 150 mg/L

De nouveaux essais sont en cours de réalisation pour l'échantillon MONO\_AH\_Air pour lequel on note une grande dispersion des valeurs. L'insolubilité dans le milieu d'incubation du matériau pourrait être à l'origine des écarts observés.

#### b. Crustacé *Artemia salina*

Les données relatives à la sensibilité du modèle biologique, sont présentées dans la Figure 9 et indiquent la réponse des spécimens lorsqu'ils sont exposés à la substance toxique de référence : le sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ).

Les pourcentages de mortalité après 48H pour les différents milieux d'exposition sont indiqués sur la Figure 10. On note une très faible mortalité chez les crustacés exposés à une concentration nominative de 150 mg de particule/L avec un comportement proche de celui observé pour le témoin. Les critères de validité étant respectés (Tableau 6) l'essai est considéré valide. De plus, l'exposition à une concentration de 10 mg/L de cuivre entraîne une réponse égale à environ 44% (proche de la réponse théorique de 50% -  $\text{CL}_{50-48\text{H}}$ ).

CRITERE	VALIDITE CRITERE	T 0	T 48H
pH	$= 8,0 \pm 0,3$	8,00	8,01
O <sub>2</sub> dissous	> 4 mg/L	> 4 mg/L	> 4 mg/L
% mortalité témoin	< 10%	-	2,25

Tableau 6: Critères de validités de l'essai

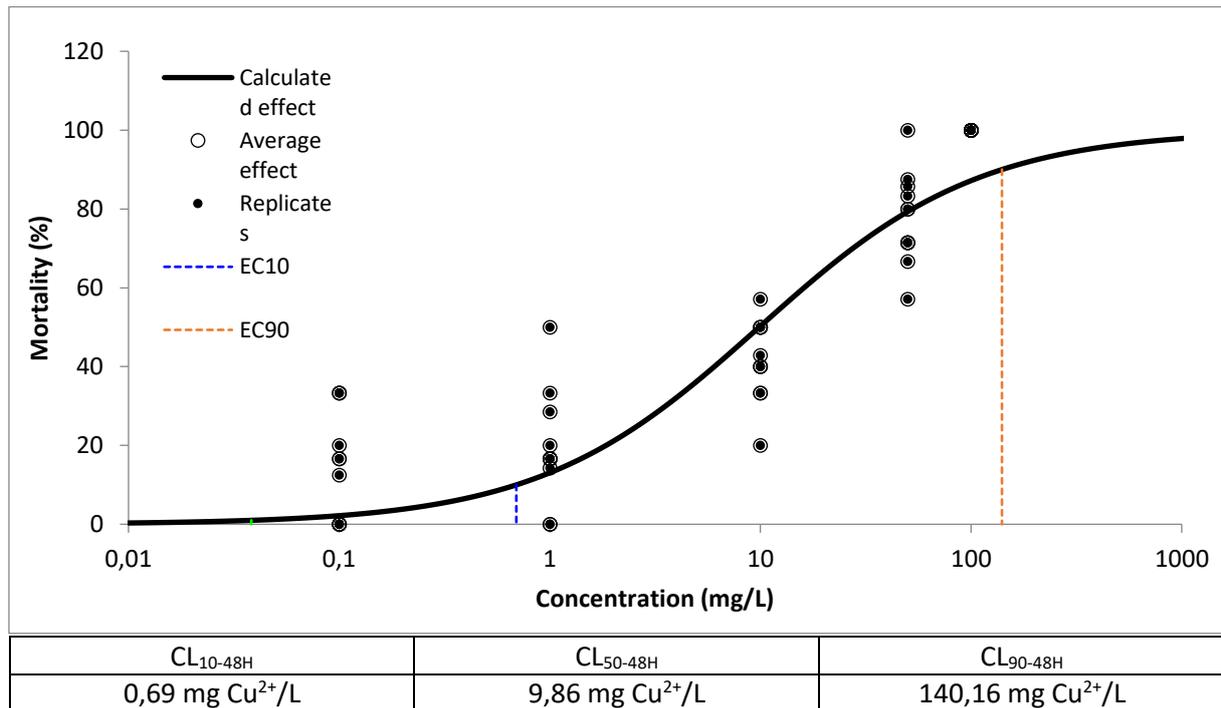


Figure 9: Courbe dose-réponse de l'exposition d'*A. salina* au sulfate de cuivre après 48H

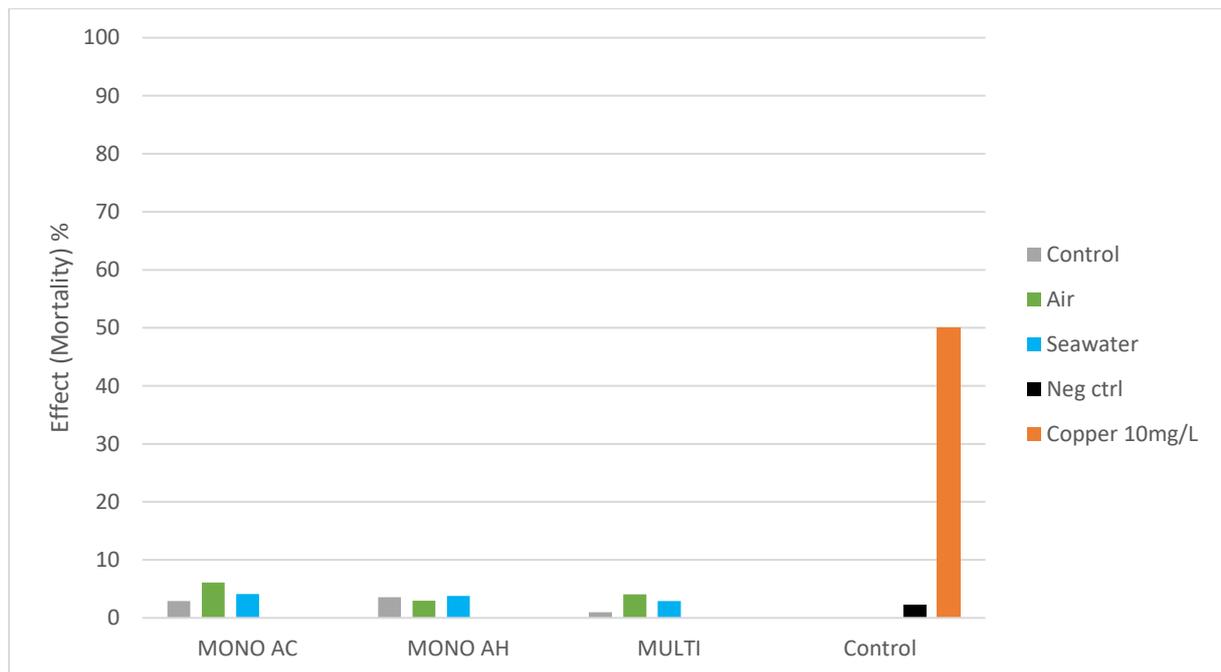


Figure 10: Mortalité observée chez les nauplii d'*A. salina* après 48H d'exposition aux milieux contaminés par les particules des matériaux testés

Il ne semble pas y avoir d'effet toxique des particules soumises à l'essai sur le copépode *A. salina*.

A partir des données obtenues il n'apparaît pas pertinent de procéder à la réalisation d'une gamme de dilution des échantillons testés car les réponses enregistrées pour une concentration de 150 mg/L sont inférieures à la CL<sub>10-48H</sub>.

c. Larve d'oursin *Paracentrotus lividus*

i. Sensibilité vis-à-vis du toxique de référence

Les résultats des essais réalisés sur la substance de référence sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) sont présentés ci-après et segmentés selon les critères d'observation considérés :

**Pourcentage de larves non-développées** (Figure 11)

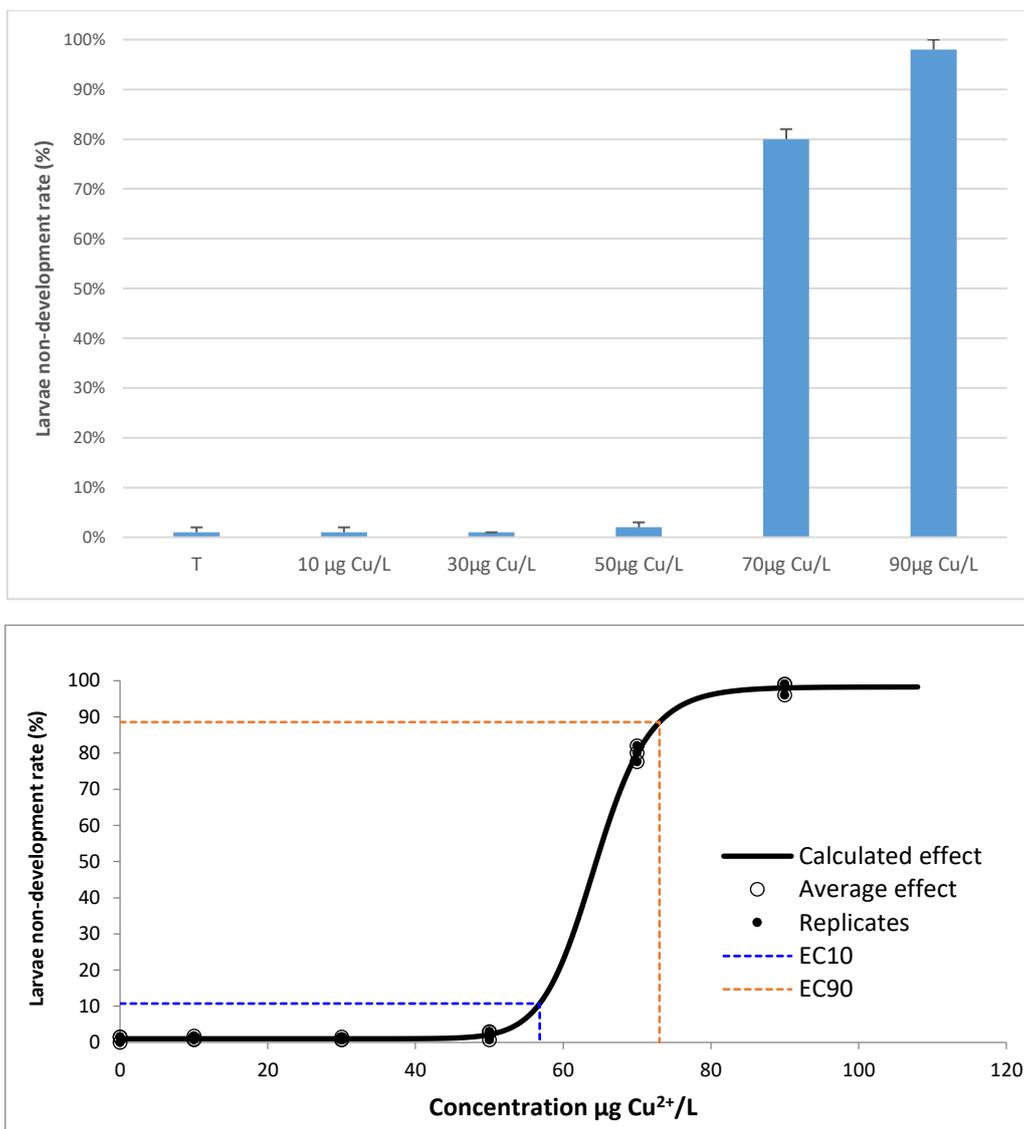


Figure 11 - Taux de non-développement larvaire dans la gamme de cuivre

Le produit est létal pour les concentrations supérieures à 70  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ . La concentration létale à 24H ( $\text{CL}_{50-24\text{h}}$ ) est évaluée par modélisation de Hill à 64,4  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ . Les paramètres  $\text{CL}_{10}$  et  $\text{CL}_{90}$  sont respectivement évalués à 56,82  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  et 73,04  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ .

**Pourcentage de larves non développées et malformées (Figure 12) :**

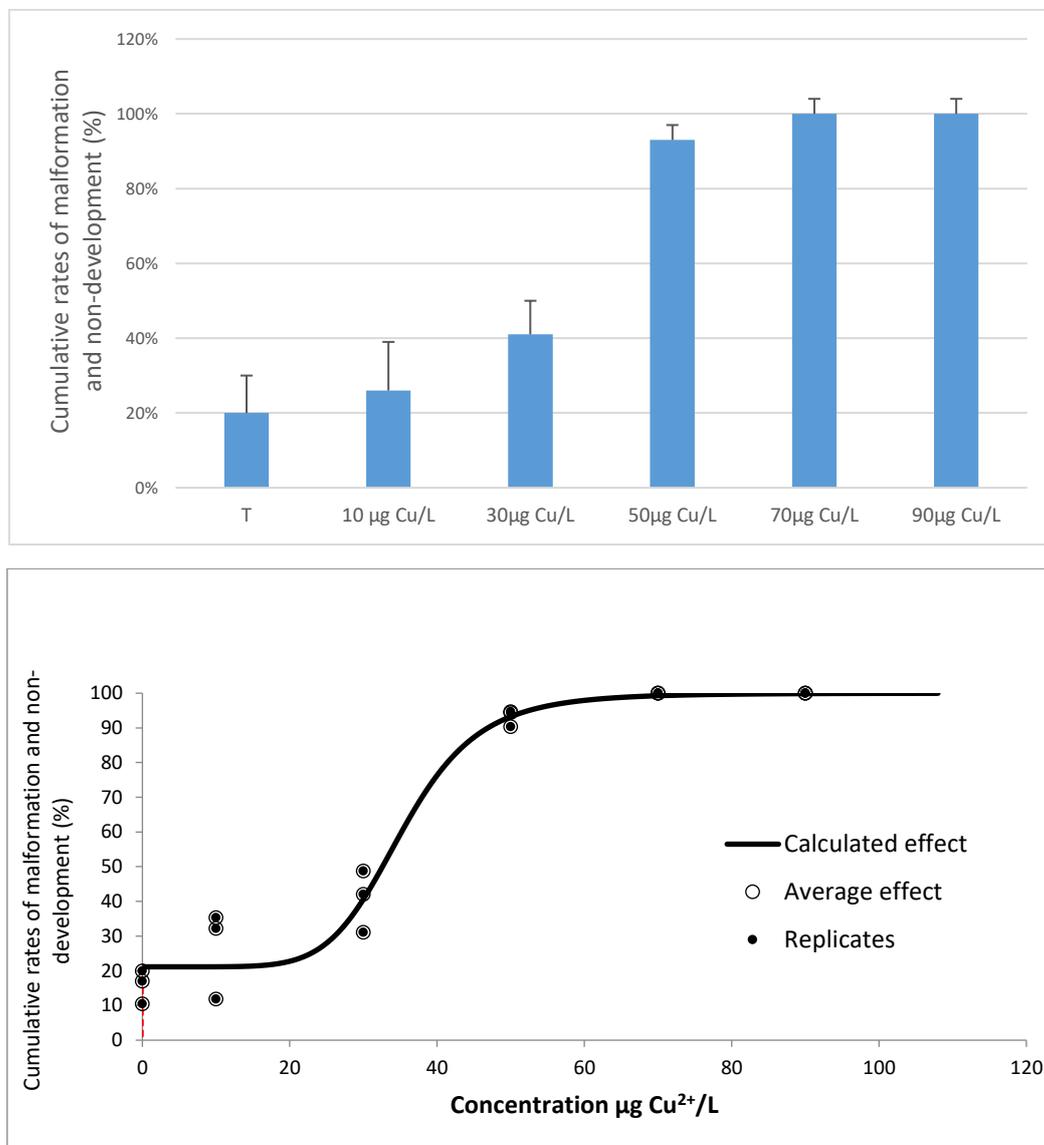


Figure 12 - Taux de non-développement et de malformation dans la gamme de cuivre

Le produit est létal pour les concentrations égales et supérieures à 70 µg Cu<sup>2+</sup>/L. La CL<sub>50-72H</sub> est évaluée par modélisation de Hill à 35,32 µg Cu<sup>2+</sup>/L. On note sur les mesures effectuées que les pourcentages cumulés de malformation et de non-développement des larves pour le témoin s'élève à 15% ± 5,5% restant inférieur à 20%. Cela ne permet cependant pas dans l'étude de déterminer le paramètre CL<sub>10</sub>. La CL<sub>90</sub> pour l'observation cumulée des malformations et du non-développement larvaire est évaluée à 48,77 µg Cu<sup>2+</sup>/L.

**Validité du contrôle positif au cuivre :**

Des malformations à un taux significativement différent du témoin sont observées sur les larves à partir de 30 µg Cu<sup>2+</sup>/L (40%). Aux concentrations égales et supérieures à 50 µg Cu<sup>2+</sup>/L, les taux cumulés de non-développement et de malformations sont au-delà de 90% et sont significativement différents du témoin eau de mer (p < 0,05). Des effets similaires sont observés dans la phase d'évaluation de la toxicité du cuivre de la méthode de standardisation utilisée (*S. Pétinay et al., (2009), p.5*). Ces différents éléments permettent de valider le contrôle positif de ce bio-essai et d'attester de la sensibilité du modèle *P. lividus* lors de l'étude.

ii. Résultats obtenus pour les échantillons vieillis

De la même manière que les essais effectués sur *A. salina* et *P. tricornutum*, les échantillons ont été préalablement vieillis et comparés à leur alter ego non vieillis afin d'être différenciant vis-à-vis de la toxicité qui serait liée à une libération de molécules par le matériau étudié.

Les codifications des échantillons relatifs aux essais de toxicité sur les larves d'oursin sont indiquées dans le Tableau 5.

**Pourcentage de larves non développées** (Figure 13) :

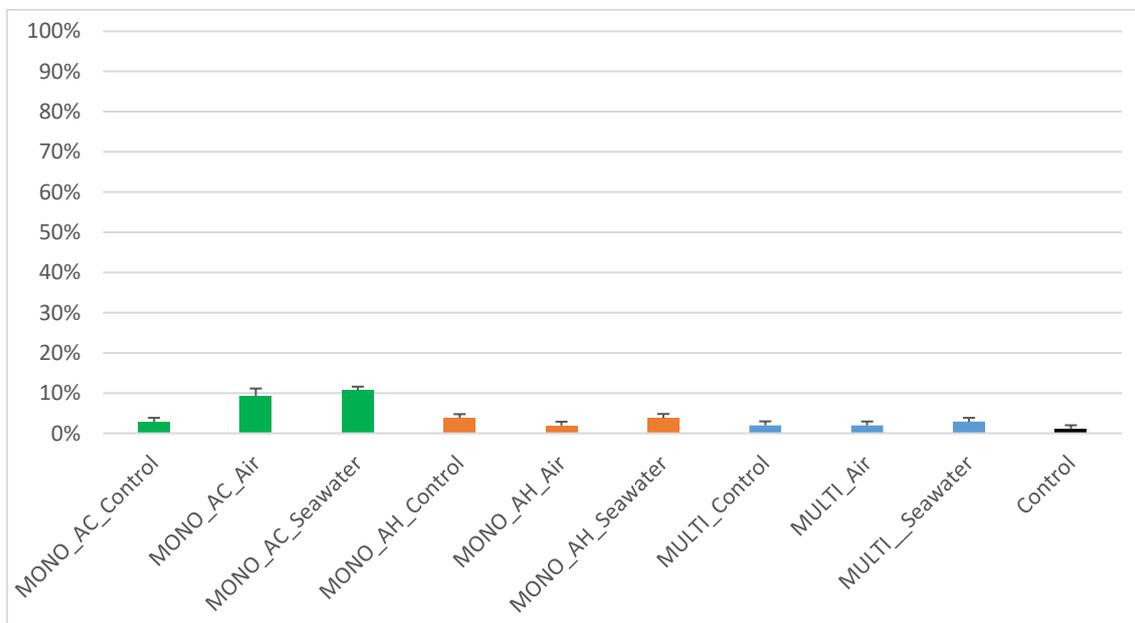


Figure 13 - Taux de non-développement en fonction de l'échantillon testé

Tous les échantillons testés présentent un taux de non-développement inférieur à 15%, ce qui signifie que la quasi-totalité des larves se sont développées au-delà de 24H. Le taux de non-développement pour le lot témoin étant de 0,33%.

**Pourcentage de larves non développées et malformées (Figure 14)**

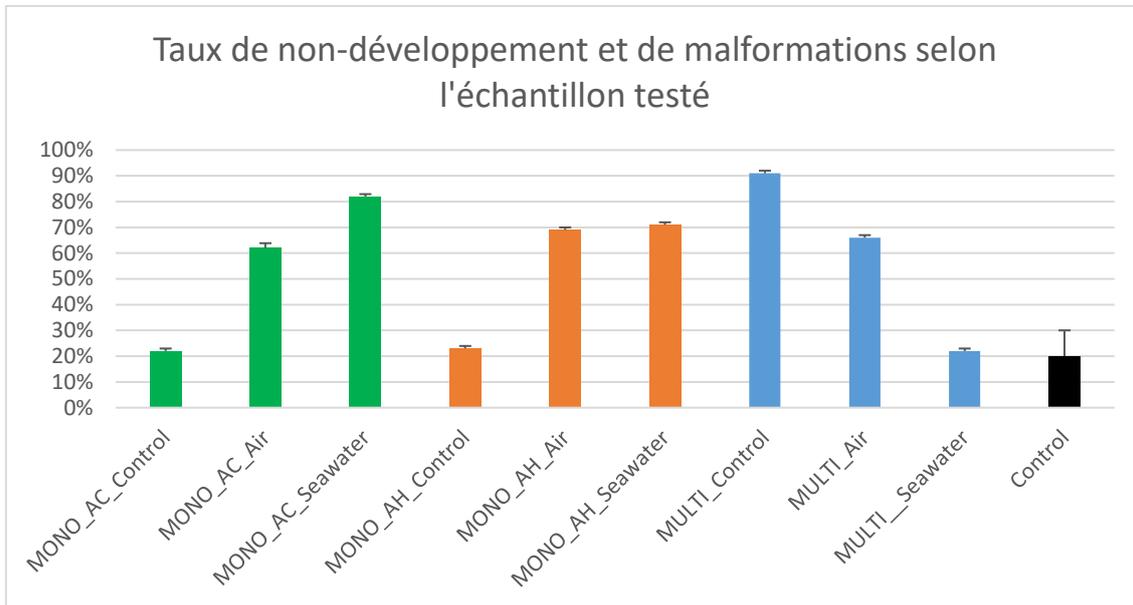


Figure 14 - Taux de non-développement et de malformations en fonction de l'échantillon testé

Les échantillons Air/Seawater pour MONO\_AC et MONO\_AH et Control/Air pour MULTI présentent des taux cumulés de non-développement et de malformations supérieurs à 50% et sont significativement différents du contrôle. Les échantillons Control de MONO\_AC et MONO\_AH ainsi que MULTI\_Seawater présentent des taux cumulés de non-développement et de malformations inférieurs à 25 % et ne sont pas significativement différents du contrôle.

**Gradient de toxicité et conclusion du bio-test :**

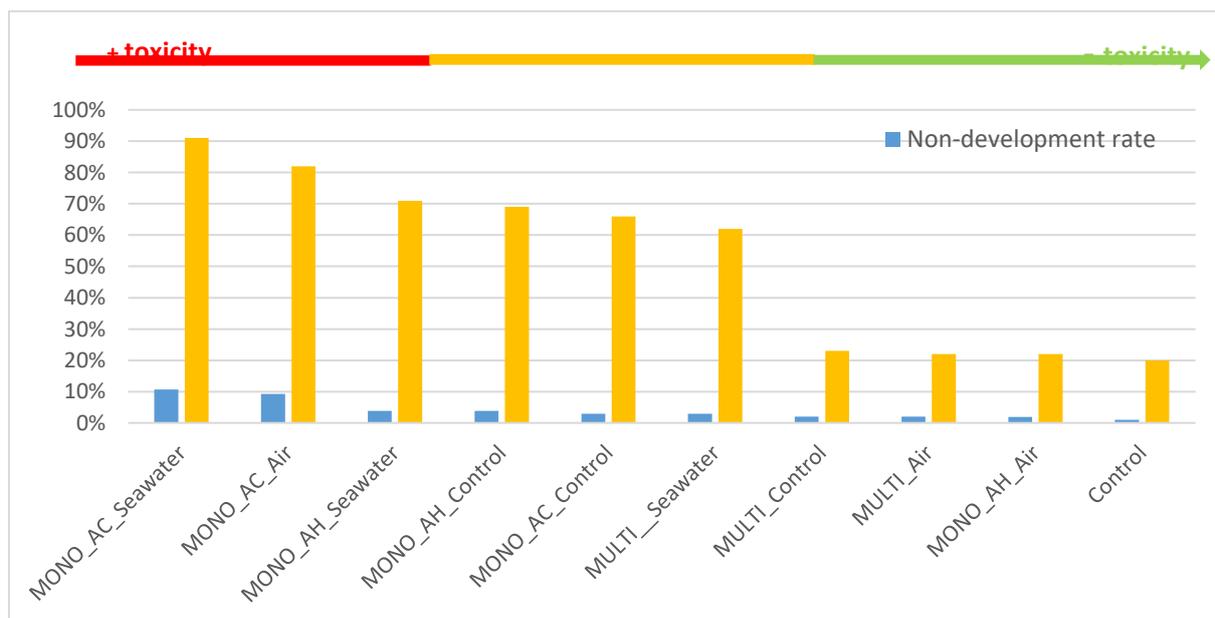


Figure 15 - Gradient de toxicité pour les neuf échantillons testés

Le taux de non-développement des larves est le critère le plus important pour constituer un gradient de toxicité des biocides testés (Figure 15). En effet, les larves restées au stade œuf fécondé, blastula ou gastrula, sont des larves mortes avant 24H (*Falugi et Angelini, 2002*). Selon cette indication, plus la moyenne du taux de non-développement est élevée, plus l'échantillon est toxique pour les larves.

Le taux de non-développement additionné au taux de malformation est le second critère important permettant d'affiner le gradient. Les larves avec des malformations sont des larves présentant des spicules absentes ou incomplètes, ou encore des spicules croisées ou écartées. (*Carballeira et al., 2012*).

Sur la base de ces indicateurs, il est possible de déterminer que les échantillons 6 (*Mono 1 AC PE Powder aged in seawater – 630mg*) et 1 (*Mono 1 AC PE Powder aged in air – 750mg*) sont les plus impactant pour les larves avec des taux de non-développement et de malformations de plus de 80%. Les échantillons 4 (*Mono 2 AH VF Powder aged in seawater – 700mg*), 5 (*Mono 2 AH VF (PE x1.5) control powder – 350mg*), 2 (*Mono 1 AC PE Powder control 100m – 750mg*) et 7 (*Multi bobine 2 aged seawater – 600mg*) se situent à un palier intermédiaire mais cependant compris entre 60% et 70%. Enfin, les échantillons 9 (*Multi bobine 2 control powder – 320mg*), 8 (*Multi bobine 2 aged in air powder – 520mg*) et 3 (*Mono 2 AH VF Powder aged in air – 760mg*) sont les moins nocifs pour les larves, chacun présentant des taux de non-développement et de malformations cumulés inférieurs à 25%.

Toutefois, ces résultats sont à interpréter avec prudence. En effet, les échantillons ont ici été testés sous forme de poudre, et l'eau n'a pas été filtrée avant d'être mise en contact avec les larves. Les débris créés par les poudres en suspension peuvent donc être à l'origine des malformations observées, affectant davantage les larves que les molécules chimiques provenant des échantillons. Il serait judicieux, si cette expérience venait à être renouvelée, de filtrer les eaux avant d'être mises en contact avec les larves, afin d'être en mesure de valider ou de réfuter cette hypothèse.

## V. DISCUSSIONS & PERSPECTIVES

L'étude de la biodégradabilité des différentes formulations montrent différents comportements allant d'une biodégradation aérobie ultime complète en 6 mois (MONO\_1\_AC) à l'apparition de plateaux seuils de l'ordre de 40% à 60% de biodégradabilité (MONO\_2\_AH, MULTI\_2). Cependant, ce type d'expérimentation s'établit sur des durées de 2 ans difficilement en adéquation avec les durées des projets collaboratifs et notamment du projet Interreg INdIGO (46 mois) pour lequel de nombreux décalages dans les réalisations ont été liés à la crise sanitaire. Les résultats présentés à ce jour ne peuvent donc en aucun cas être extrapolés pour prédire la biodégradation sur une durée supérieure à celle de l'essai. De plus, les normes de spécifications actuelles, qui fixent les seuils à atteindre pour qualifier la biodégradabilité d'un matériau, ne sont pas adaptées pour l'étude de matériaux dont la durée de vie prévue excède la durée maximale d'exposition au milieu de l'essai. Ainsi, la réalisation d'un filet de pêche biodégradable pour lequel on viserait une durée de vie supérieure à 2 ans ne pourrait valider les seuils indiqués par les normes.

Dans le cas du projet INdIGO, deux engins basés sur deux typologies distinctes, un filet fin de type mono-filament et un filet de catinage de type multi-filament ont été testés.

Dans le premier cas il est nécessaire que le prototype final conserve des propriétés mécaniques satisfaisantes pour répondre aux besoins des usagers et conserver une pêchabilité équivalente à celle des alternatives traditionnelles. Cette contrainte seule oblige donc à observer une désintégration lente du filet et donc des cinétiques de biodégradabilité maîtrisées.

Dans le second cas, il est nécessaire que le filet se désintègre entièrement au bout de 6 mois afin de retirer une étape d'interaction de l'utilisateur avec le filet et valoriser cette alternative biodégradable vis-à-vis de son alter ego traditionnel.

L'étude de la biodégradabilité permet de statuer sur le comportement des microparticules produites lors des étapes de dégradation du matériau. Il est impératif de faire la distinction entre ces deux étapes qui sont concomitantes et dépendent des paramètres tels que la température, la densité de microorganismes, la granulométrie du matériau exposé....

Les données relatives à la biodégradabilité obtenues à ce jour sont encourageante et montrent que les formulations produites sont en mesure de répondre aux exigences établies dans le cahier des charges. Il reste néanmoins à valider l'innocuité des matériaux testés sur des organismes modèle du milieu marin.

Les données toxicologiques obtenues montrent une innocuité des trois formulations étudiées. Les composés entrant dans la composition des différentes formulations ayant été choisis pour leurs qualités telles que la certification contact alimentaire. Lors de la réalisation d'une étude écotoxicologique complète il est important de considérer la notion de risque qui dépend de l'évaluation de multiples critères tels que :

- La concentration de(s) substance(s) chimique(s) dans l'environnement marin (dans l'eau, les sédiments ou les tissus des organismes marins). Cet élément clé implique également la capacité à quantifier ces éléments
- La toxicité aiguë mesurant les effets immédiats sur les organismes marins lors d'une exposition courte mais intense. Les tests de toxicité aiguë évaluent généralement la mortalité et les effets sublétaux.
- La toxicité chronique mesurant les effets à long terme d'une substance chimique (ou d'un cocktail de substances) sur les organismes marins. Les tests de toxicité chronique évaluent les effets sur la reproduction, la croissance et le développement des organismes exposés sur une période prolongée.
- La persistance dans l'environnement marin permet d'indiquer sa durée de vie. Les substances persistantes peuvent s'accumuler dans les écosystèmes marins et avoir des effets à long terme.
- La bioaccumulation qui évalue la capacité d'une substance chimique à s'accumuler dans les tissus des organismes vivants au fil du temps. Les substances qui s'accumulent peuvent atteindre des concentrations toxiques dans les organismes marins et perturber les fonctions biologiques.
- Le transport et la dispersion des substances dans l'environnement marin pour comprendre leur propagation et leur exposition potentielle aux organismes. Cela comprend l'étude des courants océaniques, des marées, des courants de surface et des processus de mélange.

- Les effets sur les écosystèmes qui vont au-delà de l'organisme seul et prennent également en compte les effets sur les écosystèmes marins dans leur ensemble. Cela comprend l'évaluation des interactions écologiques, de la biodiversité, des fonctions écosystémiques et de la résilience.

Les essais réalisés dans le projet INDIGO portent sur les effets toxiques aigus et semi-chroniques. Dans le cas de substances chimiques solubles il est aisé d'évaluer la toxicité dans les différents compartiments du milieu marin. En revanche dans le cas des matériaux polymères plastiques il devient difficile de réaliser cette évaluation de par la nature insoluble du matériau, de la temporalité de lixiviation des substances relargables qui pourraient présenter une toxicité et donc de la période de vieillissement à laquelle les essais doivent être réalisés. Si l'on prend pour référence l'évaluation toxicologique en compostage industriel, celle-ci est réalisée sur le compost ayant été utilisé pour attester du caractère désintégré du matériau et donc après un certain degré de vieillissement du matériau. Cependant, aucunes mesures quantitatives ne sont effectuées (données non requises par les normes en vigueur) et il n'est donc pas possible de relier une toxicité à l'état physico-chimique du matériau au moment de l'essai. C'est à ce jour le principal problème car un matériau peut être désintégré sans pour autant présenter une libération suffisante de substances dans le milieu de l'essai (notion de dette plastique Figure 20) entraînant une réponse toxicologique.

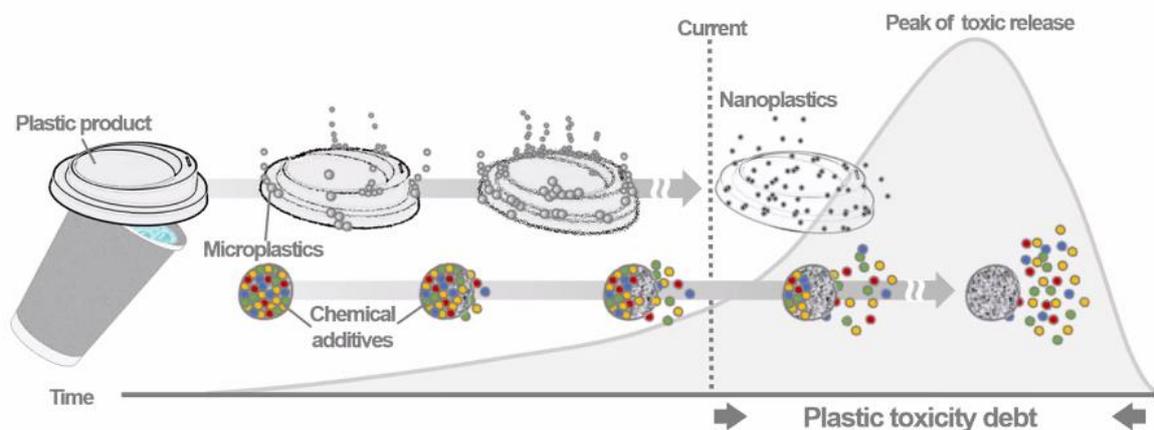


Figure 16: Dette toxique (credit : Rillig et al. 2021, Env Sci Techn)

Cette notion de dette toxique se reflète au travers de réponses toxicologiques négatives sur des niveaux trophiques tels que les crustacés, les microalgues pour lesquelles les quantités de substances présentes dans le milieu seraient bien en deçà des quantités nécessaires à l'observation d'une réponse toxique et ce lié à la possibilité que les microparticules produites lors de la dégradation du matériau n'aient pas atteint le stade critique de taille induisant la libération des substances potentiellement impactantes. Les expérimentations mettraient ainsi en avant des mécanismes de toxicité de contact plutôt que d'une toxicité chimique liée aux substances. Enfin, dans le cadre des essais réalisés, le matériau vieilli est non soluble dans l'eau de mer et les particules de plastique visibles à l'œil nu ont sédimenté. Ce comportement exerce une influence car la disponibilité du matériau testé n'est pas optimale.

Cette première approche toxicologique reste néanmoins prometteuse et il semble pertinent de poursuivre les analyses en s'intéressant aux effets observés à long terme et si possible en évaluant le risque toxicologique.

Toutes ces données montrent l'importance d'adapter les outils scientifiques à la thématique de l'impact des matériaux plastiques sur l'environnement marin et plus particulièrement les plastiques biodégradables. A ce jour, les outils permettant d'obtenir les informations nécessaires à l'élaboration d'une Analyse de Cycle de Vie (ACV) intègrent très mal les indicateurs toxicologiques et ne permettent pas la valorisation de solutions biodégradables lorsque l'on considère des facteurs de Réchauffement Climatique liés aux quantités de CO<sub>2</sub> émises. Le processus de biodégradation émettant entre autres du CO<sub>2</sub>, ce dernier représente donc un impact négatif selon les critères retenus pour la réalisation de l'ACV.