

Mémoire

Auteur : Brusselman, Axelle

Promoteur(s) : Gobert, Sylvie; 2874

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en océanographie, à finalité approfondie

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/11176>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Faculté des sciences

Laboratoire d'Océanologie Biologique

Océanologie 
biologique



En collaboration avec l'université de Mons

Faculté des sciences

Laboratoire de Protéomie et Microbiologie



Suivi de la dégradation de plastiques biodégradables en fonction de paramètres abiotiques ainsi que de la dynamique des biofilms bactériens en milieu marin

Axelle Brusselman

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du
grade de Master en Océanographie, à finalité approfondie

Promoteur : Sylvie Gobert

Co-promoteur : Ruddy Wattiez

Encadrante : Alice Delacuvellerie

Année académique 2020-2021

« Conformément aux règles imposées à la rédaction, ce mémoire ne doit pas dépasser 50 pages, rédigées en Times 12 ou équivalent »

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice Sylvie Gobert pour m'avoir proposé ce sujet de mémoire et m'avoir accompagné durant cette année. Je tiens à la remercier pour ses conseils, ses relectures et les encouragements tout au long de ce mémoire ainsi qu'à la confiance et la patience qu'elle a pu avoir à mon égard.

Je tiens à remercier mon co-promoteur Ruddy Wattiez pour avoir accepté cette collaboration et de m'avoir permis de travailler au sein de son laboratoire. Je remercie également, toutes les personnes au sein du laboratoire de Protéomie et Microbiologie de l'université de Mons pour leur accueil chaleureux et leur aide au laboratoire. Je remercie également Samira Benali du laboratoire de Matériaux Polymères et Composites de l'Université de Mons pour m'avoir permis l'accès à son laboratoire pour la préparation et l'analyse des plastiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadrante Alice Delacuvellerie sans qui ce mémoire n'aurait simplement pas été possible. Je la remercie énormément pour tous les conseils et l'aide apportée en laboratoire malgré les difficultés et durant la rédaction de mon mémoire. Elle a toujours été présente et un réel soutien durant cette année. A ces côtés, j'ai appris à développer un regard critique et une méthodologie scientifique solide. Je tiens à la remercier sincèrement pour tous les bons moments durant cette année ainsi que pour toute l'aide apportée.

Je remercie également ma famille et plus particulièrement ma maman et ma sœur pour leurs corrections et leur soutien durant toutes mes études. Je remercie Thomas pour son soutien durant cette année ainsi que toutes nos discussions scientifiques qui m'ont souvent donné de nouvelles idées. Je remercie également Théo et Laurence pour leur soutien, leurs corrections et leur enthousiasme vis-à-vis de mon sujet. Je remercie tous mes amis, Océane, Shirley, Tom, Dany, Raf, Quentin, Lucile, Amandine, Meriem, Maurine et Thomas.H pour leur soutien et les bons moments passés ensemble durant toutes mes études. Pour finir, je remercie toutes les personnes de ma promotion d'océanographie pour tous les bons moments passés durant ces deux années de master.

Résumé

Cette étude a pour but de suivre la dégradation et la dynamique des communautés bactériennes se développant sur des plastiques biodégradables en milieu marin ainsi que l'impact de paramètres abiotiques (température et radiations UVs) sur la dégradation de ceux-ci.

Pour cela, trois plastiques biodégradables (PBAT, PLA semi cristallin et PLA amorphe) ainsi qu'un plastique non biodégradable servant de référence (PS) ont été immergés en milieu marin pour une durée totale de huit mois, avec trois prélèvements à différents temps (3, 5 et 8 mois). En parallèle, les mêmes plastiques ont été immergés dans une eau de mer artificielle pendant deux mois à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C) avec exposition à une lampe UV ou non. Chaque plastique va ensuite être analysé de manière chimique par perte de poids, DSC, GPC et ATR-FTIR pour déterminer si une dégradation a eu lieu. Les biofilms développés à la surface des plastiques de l'aquarium ont été récupérés et ont été analysés de manière microbiologique par PCR et DGGE.

Les analyses chimiques mettent en évidence une faible dégradation du PBAT après huit mois d'immersion et aucune différence significative pour les autres plastiques. La température et l'exposition aux UVs accélèrent la dégradation des plastiques biodégradables après deux mois d'immersion. Les communautés bactériennes semblent utiliser les plastiques comme support plutôt que comme source de carbone excepté pour le PBAT qui a une dégradation plus marquée et une sélection de sa communauté bactérienne ce qui pourrait signifier un rôle des bactéries dans sa dégradation.

Ces résultats mettent en avant la faible dégradation des plastiques biodégradables en milieu marin ainsi que l'impact de paramètres abiotiques sur cette dernière. Il permet aussi de mettre en évidence le potentiel de certains plastiques, comme le PBAT, à être dégradé et servir de source de carbone aux bactéries du milieu marin.

Il est donc primordial de créer des normes adéquates pour définir les plastiques comme biodégradables dans le milieu marin ainsi que d'améliorer la gestion des déchets plastiques afin d'augmenter leur recyclage.

Abstract

The aim of this study is to follow the degradation and the dynamic of bacteria communities which develop on biodegradable plastics in marine environment and the impact of abiotic parameters (temperature and UV radiation) on their degradation.

For that, three biodegradable plastics (PBAT, semi-crystallin PLA and amorphous PLA) and a non-biodegradable plastic using as a reference (PS) are immerge in a marine environment for eight months, with three different sampling times (3, 5 and 8 months). At the same time, the same plastics are immersed in artificial sea water for two months at different temperatures (4°C, 20°C and 35°C) with and without an exposure to UV light. Each plastic is analyzed by chemicals technics such as weight lost, DSC, GPC and ATR-FTIR to determine if a degradation occurred. The biofilms which developed on the plastics are collected and analyzed by microbiological technics as PCR and DGGE.

The chemical analysis show little degradation of PBAT after eight months of immersion and no significant differences for other plastics. The temperature and UV exposure accelerate the degradation of biodegradable plastics after two months of immersion. The bacteria communities use the plastics as a support more than a carbon source except for the PBAT which has a more marked degradation and a selection of its bacteria community which potentially mean a role in the degradation of plastic.

These results show the little degradation of biodegradable plastics in marine environment and the impact of abiotic parameters on it. It also highlights the potential of some plastics, like PBAT, to be degrade and use as a carbon source by bacteria on a marine environment.

It is therefore essential to create adequate standards to define plastics as biodegradable in the marine environment as well as to improve the management of plastic waste to increase their recycling.

Liste des abréviations

PCB	PolyChloroBiphényles
UV	UltraViolet
PVC	PolyChlorure de Vinyle
BPA	BisPhénol A
PBDE	PolyBromoDiphénylEthers
TBBPA	TetraBromoBisPhenol A
PET	PolyTéréphtalate d'Ethylène
PLA	Acide PolyLactique
PBAT	PolyButylène Adipate Téréphtalate
PBS	PolySuccinate de Butyle
PHA	PolyHydroxyAlcanoates
LDPE	PolyEthylène Basse Densité
HDPE	PolyEthylène Haute Densité
PP	PolyPropylène
PS	PolyStyrène
POC	Polymérisation par Ouverture de Cycle
PAH	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
EPS	ExoPolySaccharides
TPA	Acide TéréPhtalique
EG	Ethylène Glycol
ATR-FTIR	Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier par Réflectance Totale Atténuée
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage
GPC	Chromatographie sur Gel Perméable
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
DGGE	Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant
M_n	Masse molaire moyenne en nombre
D_M	Dispersité
T_g	Température de transition vitreuse
T_m	Température de fusion
χ_c	Taux de cristallinité

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Production globale de plastique de 1950 à 2015 (Geyer et al, 2017).....	1
Figure 2. Nombre d'articles sur différents aspects de la question des déchets marins publiés tous les cinq ans au cours des 50 dernières années (sur la base d'une recherche Web of Science et d'une bibliographie non publiée; notez que la dernière colonne ne couvre que trois ans, 2011-2013) (Ryan, 2015).....	2
Figure 3. Structure chimique du phtalate (a), du BPA (b), du PBDE (c) et du TBBPA (d).....	5
Figure 4. Réaction radicalaire de photo-oxydation (Singh & Sharma, 2008)	7
Figure 5. Schéma de la biodégradation de polymère en conditions aérobiques et anaérobiques traduit de (Gu, 2003)	8
Figure 6. Une représentation schématique des étapes que passe une nouvelle espèce bactérienne pour former un biofilm sur une roche précédemment colonisée par plusieurs espèces de bactéries (ronds rouges, bleus et blancs). Les bactéries jaunes représentent une espèce aquatique qui nage vers la roche à l'aide de flagelles polaires, formant des attaches aléatoires à la roche, migre à la surface pour former une microcolonie et finalement produit un exopolysaccharide (rond orange) pour former un biofilm tridimensionnel. Traduit de (Watnick & Kolter, 2000)	10
Figure 7. Illustration schématique de l'adhésion bactérienne et des effets des propriétés des matériaux dans des environnements complexes traduits de (Song et al, 2015)	10
Figure 8. Influence de l'humidité, de la température et de la concentration de microorganismes (appropriés) sur la biodégradation du PLA dans différents environnements. Traduit de (Haider et al., 2019).....	14
Figure 9. Schéma représentant l'origine et la biodégradabilité de trois types de plastique (PLA, PS et PBAT)	14
Figure 10. Structure chimique du PBAT	15
Figure 11. Mécanisme d'hydrolyse du PBAT traduit de (Al-Itry et al, 2012).....	16
Figure 12. Structure chimique du PLA.....	16
Figure 13. Mécanisme d'hydrolyse du PLA traduit de (Al-Itry et al, 2012).....	18
Figure 14. Structure chimique du PS.....	18
Figure 15. Cadre de plastique placé à l'aquarium.....	21
Figure 16. Bassin de quarantaine d'eau froide de l'Aquarium-Muséum de Liège où sont placés les trois cadres de plastique.....	21
Figure 17. Schéma du dispositif expérimental, chaque rond représente une boîte comprenant chaque type de plastique en quatre répliques.....	26
Figure 18. Photos des films plastiques de PS, PBAT, PLA-4032D (semi-cristallin) et PLA-4060D (amorphe) après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C) sous exposition d'une lampe UV	28
Figure 19. Evolution de la perte de poids du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin	29
Figure 20. Evolution de la perte de poids du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à 4°C, 20°C et 35°C	29
Figure 21. Perte de poids du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C) et du PBAT (D) après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à 4°C, 20°C et 35°C avec exposition à une lampe UV (orange) ou non (bleu). T-test non-apparié ; ns, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$	30
Figure 22. Spectre ATR-FTIR normalisés du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C), PBAT (D) sans immersion (ti) et après 3, 5 et 8 mois d'immersion dans un milieu marin. L'encadré rouge met en évidence l'apparition de pic.	31
Figure 23. Spectre ATR-FTIR normalisés du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C), PBAT (D) non immergé (Ti) et après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C, 35°C) et sous lampe UV. Les encadrés rouges mettent en évidence l'apparition de pics. 32	

Figure 24. Evolution de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de la dispersité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et PLA-4060D après 0, 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu	34
Figure 25. Evolution de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de la dispersité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et PLA-4060D après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C). Les traits pointillés correspondent à la valeur des plastiques de références non immergé	34
Figure 26. Evolution de la température de transition vitreuse (A) et du taux de cristallinité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D avant immersion et après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin	36
Figure 27. Evolution de la température de transition vitreuse (A) et du taux de cristallinité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C et 35°) et sous lampe UV. Les droites en pointillés représentent la valeur du paramètre du plastique non immergé.....	36
Figure 28. Photos des biofilms qui se sont développés sur les plastiques (PS, PLA-4032D, PLA-4060D et PBAT) après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin.....	37
Figure 29. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après trois mois d'immersion en milieu marin. Les encadrés rouges mettent en évidence les bandes majoritaires.....	38
Figure 30. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après cinq mois d'immersion en milieu marin.	39
Figure 31. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après huit mois d'immersion en milieu marin.	40
Figure 32. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après trois, cinq et huit mois d'immersion en milieu marin.....	41

Tableau 1. Tableau des critères des plastiques biodégradables dans trois milieux de dégradation en conditions aérobiques (Harrison et al., 2018).....	13
Tableau 2. Volume des réactifs en microlitre pour effectuer la touchdown PCR de la DGGE d'un échantillon	25
Tableau 3. Paramètres GPC de la masse molaire moyenne en nombre (M_n) et de la dispersité (\mathcal{D}_M) pour des plastiques sans immersion (t_i), et après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin	33
Tableau 4. Paramètres DSC de la température de transition vitreuse (T_g), de la température de fusion (T_m) et du taux de cristallinité (χ_c) pour le PLA-4032D, le PLA-4060D, le PBAT et le PS sans immersion (t_i) et à 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin.....	35

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Problématique du plastique	1
1.1.1 Les macroplastiques	3
1.1.2 Les microplastiques	4
1.2 La dégradation du plastique en milieu marin	6
1.2.1 La photo-oxydation	6
1.2.2 La biodégradation	7
1.3 LA formation de biofilms sur le plastique en milieu marin	9
1.3.1 Le substrat	10
1.3.2 L'hydrodynamique	11
1.3.3 Caractéristique du milieu	11
1.4 Les plastiques biodégradables et non biodégradables	12
1.4.1 PBAT	15
1.4.2 PLA-4032D et PLA-4060D	16
1.4.3 PS	18
2. Objectifs	19
3. Matériel et méthodes	20
3.1 Presse des plastiques	20
3.2 Dispositif expérimental de l'aquarium	20
3.3 Récupération du biofilm	22
3.4 Analyses chimiques	22
3.4.1 Méthode de perte de poids	22
3.4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflectance totale atténuée 23	
3.4.3 Calorimétrie différentielle à balayage	23
3.4.4 Chromatographie d'exclusion stérique	24
3.5 Analyses microbiologiques	24
3.5.1 Extraction d'ADN	24
3.5.2 Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant	25
3.6 Dispositif expérimental de l'expérience de température et d'exposition UV	26
3.7 Analyse statistique des données	27
4. Résultats	28
4.1 Analyses chimiques	28
4.1.1 Perte de poids	28
4.1.2 ATR-FTIR	31

4.1.3	GPC.....	32
4.1.4	DSC.....	35
4.2	Analyse microbiologique.....	37
4.2.1	DGGE.....	37
5.	Discussion.....	42
5.1	Analyses chimiques.....	42
5.1.1	Expérience à l'aquarium.....	42
5.1.2	Expérience en laboratoire.....	44
5.2	Analyse microbiologique.....	46
5.2.1	DGGE.....	46
6.	Conclusion et perspectives.....	49
7.	Bibliographie.....	50
8.	Annexes.....	56

1. Introduction

1.1 Problématique du plastique

Le plastique est devenu un élément indispensable de notre vie quotidienne. Ces propriétés telles que sa légèreté et sa résistance à la dégradation chimique et physique en font un matériel prisé pour tout type d'utilisation (construction, automobile, emballage...).

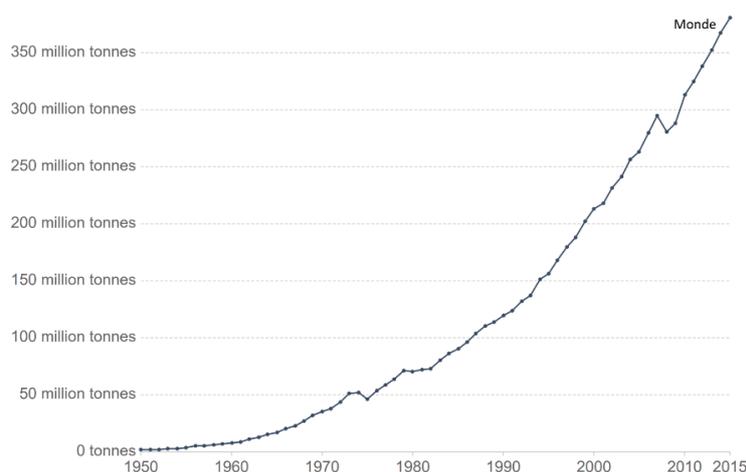


Figure 1. Production globale de plastique de 1950 à 2015 (Geyer et al, 2017)

Sa production a commencé dans les années cinquante et n'a cessé d'augmenter durant le dernier siècle (Figure 1) pour atteindre plus de 350 millions de tonnes en 2017 avec un développement des plastiques à usage unique (PlasticsEurope, 2018). Ce sont ses propriétés qui en ont fait son succès et qui en font également une menace pour l'environnement. En effet, nous ne sommes capables de recycler qu'une petite partie du plastique produit. En 2016, 27 millions de tonnes de plastiques étaient recyclées soit moins de 10% de la production globale (PlasticsEurope, 2018). De plus, la gestion de nos débris n'étant pas optimale, une grande partie n'arrive pas jusqu'aux industries de tri et se retrouve dans l'environnement. Cette pollution plastique est divisée en deux catégories en fonction de leur origine : (i) la pollution d'origine terrestre qui équivaut à 80% de la pollution plastique totale et (ii) la pollution d'origine marine qui est les 20% restant (Li et al, 2016). (i) La pollution d'origine terrestre vient de la mauvaise gestion de nos déchets. Ceux-ci peuvent atteindre les mers et océans par plusieurs voies. Une partie du plastique est stockée dans des décharges où il prend des années à être dégradé et, en se fragmentant, peut se retrouver disséminé dans l'environnement. Une autre partie du plastique n'est même pas recyclée et directement jetée sur la voie publique, les plages, les forêts... Les rivières et le vent deviennent alors un vecteur de propagation de ce plastique vers les mers et océans. Ces plastiques sont principalement des emballages, des bouteilles, des objets du

quotidien type brosse à dents, bouchon de bouteille...(Jambeck *et al.*, 2015). De plus, les événements climatiques extrêmes tels que les ouragans ou les inondations augmentent la quantité de plastique transporté jusqu'aux océans (Barnes *et al.*, 2009). (ii) L'origine marine est principalement due à l'activité de l'industrie de la pêche comme des filets et des lignes de pêches dans l'eau. Ces lignes et filets sont extrêmement résistants et ont une flottabilité bien spécifique qui va les faire dériver entre deux eaux. Ceci entraîne de la pêche fantôme où des espèces restent bloquées dans des filets et meurt d'épuisement (Good *et al.*, 2010).

La littérature scientifique a énormément évolué au cours du temps concernant la pollution plastique (Figure 2). Les premiers signes d'inquiétude sont apparus fin des années soixante avec principalement des articles sur le contenu de l'estomac d'oiseaux marins contenant du plastique, mais également la suffocation de phoques et de poissons causant leurs morts (Kridler & Kenyon, 1969). Dans les années septante, les recherches continuent et on s'attarde plus sur la source et la quantité de plastique dans l'océan. Les scientifiques découvrent également que des polluants tels que les polychlorobiphényles (PCB) s'adsorbent au plastique et représentent une menace pour l'environnement (Carpenter & Smith, K. L., 1972). Dans les années quatre-vingt, la recherche continue dans ce sens et des recommandations de la communauté scientifique émergent pour une meilleure gestion des déchets plastiques ainsi qu'un meilleur contrôle des usines de production.

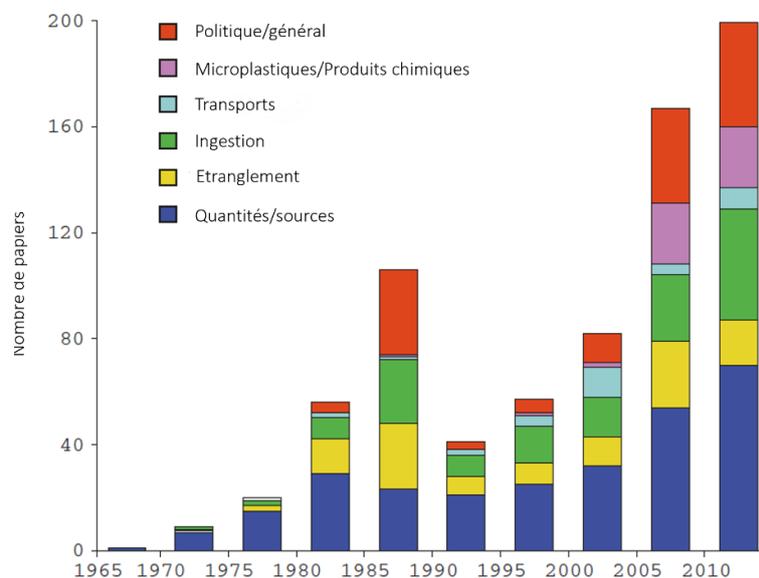


Figure 2. Nombre d'articles sur différents aspects de la question des déchets marins publiés tous les cinq ans au cours des 50 dernières années (sur la base d'une recherche Web of Science et d'une bibliographie non publiée; notez que la dernière colonne ne couvre que trois ans, 2011-2013) (Ryan, 2015)

Dans les années nonante, la recherche sur les plastiques dans l'océan a diminué, car les causes et conséquences de cette pollution avaient été identifiées et des mesures prises. Ce n'est que

dans les années 2000 que la recherche a repris plus rapidement avec la confirmation de la dangerosité des microplastiques, ainsi que la découverte du « Pacific garbage patch » et donc la mise en évidence de zones d'accumulation du plastique dans les océans.

Les scientifiques ont décidé de séparer les plastiques en deux catégories en fonction de leurs tailles : les macro- et les microplastiques. Ces différences de tailles impliquent des caractéristiques physiques et un impact sur l'environnement différent.

1.1.1 Les macroplastiques

Les macroplastiques sont les premiers déchets plastiques à avoir été étudiés. Ce sont les plastiques ayant une taille supérieure à cinq millimètres et visible à l'œil nu (Arthur *et al*, 2009). Les effets néfastes de ces plastiques sont facilement observables et donc les premiers à avoir été étudiés.

Ce sont Kridller et Kenyon qui, en 1969, ont été dans les premiers à retrouver du plastique dans les estomacs d'albatros. Ils ont conclu que les albatros adultes ingéraient par inadvertance le plastique flottant à la surface de l'eau et le transmettaient aux juvéniles en les nourrissant par régurgitation. Une fois dans l'estomac, les plus gros morceaux de plastique viennent boucher les intestins et l'estomac et entraînent la mort des juvéniles (Kridller & Kenyon, 1969). Cette théorie selon laquelle le plastique dans l'estomac entraîne la mort des individus a été confirmée des années plus tard (Ryan, 1988). En effet, l'étude menée sur des poulets prouve que le plastique prend de la place dans l'estomac, entraînant une diminution de la quantité de nourriture ingérée et donc la mort.

Une autre menace des macroplastiques est l'enchevêtrement. En effet, certains morceaux de plastique peuvent s'attacher autour de membres des animaux marins et leur causer des lésions voire la mort. Le problème a très vite été repéré notamment pour les otaries qui sont des animaux attirés par les débris plastiques. En effet, ces animaux sont très curieux et joueurs et ont tendance à venir glisser leur tête dans des débris de plastique. En grande majorité, ce sont des filets de pêche qui restent attachés à l'animal (Pemberton *et al*, 1992). Ces débris peuvent causer un coût énergétique plus grand pour les déplacements de l'individu (Feldkamp *et al*, 1989). Ce qui a pour conséquence un besoin d'apport en nourriture plus grand qui ne peut pas toujours être comblé et l'individu peut donc mourir de faim. Les débris peuvent également limiter les mouvements et donc ralentir un individu l'empêchant de fuir devant une menace ou, au contraire, d'être efficace dans la poursuite d'une proie (Scordino, 1985). L'enchevêtrement peut également causer des blessures dues à la friction et à la croissance de l'individu (Jones,

1995). De plus, des études et observations plus récentes montrent que le nombre d'individus s'enchevêtrant dans du plastique a triplé depuis 1990. Plus de 90% des cas étant dû à des filets de pêche abandonnés (Baulch & Perry, C. , 2014).

1.1.2 Les microplastiques

Le terme microplastique désigne généralement tous les plastiques devant être analysés au microscope pour être clairement identifiés. La littérature définit leur taille comme inférieure à 5 millimètres (GESAMP, 2015). Il faut différencier deux sortes de microplastiques : les microplastiques primaires et les secondaires.

Les microplastiques primaires sont ceux qui ont été fabriqués directement à une taille inférieure à 5 millimètres (Cole *et al.*, 2011). Ces plastiques ont différentes origines et utilités, la majorité vient des produits cosmétiques. En effet, ils sont utilisés sous forme de petites billes avec des tailles variables pour exfolier le visage ou nettoyer les mains (Zitko & Hanlon, 1991). Ces produits sont principalement composés de polyéthylène, polystyrène et de polypropylène. Une autre utilisation est le transport de médicaments vers des zones cibles. Cette technique est notamment utilisée pour des agents anticancers, car le polymère permet une meilleure pénétration du médicament (Patel *et al.*, 2009). La troisième utilisation la plus commune est le sablage de différentes machineries ou surfaces. Le principe est de projeter un plastique (urée-formaldéhyde, mélamine-formaldéhyde, phénol-formaldéhyde, acrylique...) à haute pression sur une surface pour en décaper la peinture ou le coating présent (Deel, 1995). La mauvaise gestion des déchets provoqués par ces utilisations (rejet direct dans l'eau, rejet d'industrie...) entraîne une pollution de l'environnement marin par ces microplastiques.

Les microplastiques secondaires sont, quant à eux, des plastiques de plus grandes tailles qui ont subi une dégradation jusqu'à arriver à des débris de tailles inférieures à 5 millimètres (Thompson, 2006; Ryan *et al.*, 2009). La dégradation du plastique se fait sous l'effet de l'oxydation, des rayonnements UV et de la température (Baum, 1974). Ces phénomènes seront expliqués plus loin dans la section dédiée à la dégradation du plastique (section 1.2).

Les microplastiques peuvent avoir des effets néfastes similaires aux macroplastiques. L'ingestion est un effet commun aux différentes tailles de plastique. Mais pour les microplastiques ce problème prend une tout autre importance, car cette ingestion est possible par de plus petits individus et donc commence à un niveau trophique beaucoup plus bas (Barnes *et al.*, 2009), comme le zooplancton (Desforges *et al.*, 2015). Cela amène un phénomène de biomagnification. En effet, quand un producteur primaire ingère du plastique celui-ci va le

transmettre à des niveaux trophiques plus élevés par le biais de la chaîne alimentaire. La concentration de plastique va donc devenir de plus en plus importante au fur et à mesure que nous nous situons haut dans la chaîne alimentaire. Les microplastiques touchent donc à plus grande échelle les espèces marines et in fine l'homme par sa consommation de produits de la mer (Revel *et al.*, 2018).

L'ingestion de ces particules a un autre effet néfaste. Effectivement, les additifs contenus dans le plastique peuvent être relâchés dans l'organisme. Les phtalates sont utilisés comme plastifiant sur les polymères à haute masse moléculaire, notamment le polychlorure de vinyle (PVC), pour les rendre plus souples. Le bisphénol A (BPA) est utilisé pour la production de plastique et de résine époxy (Huang *et al.*, 2012). Les polybromodiphényléther (PBDE) et le tetrabromobisphénol A (TBBPA) sont utilisés comme retardant de flamme (Rahman *et al.*, 2001). Toutes ces molécules (Figure 3) font partie des perturbateurs endocriniens qui vont avoir des effets sur la croissance, la reproduction, l'expression des gènes... (Talsness *et al.*, 2009).

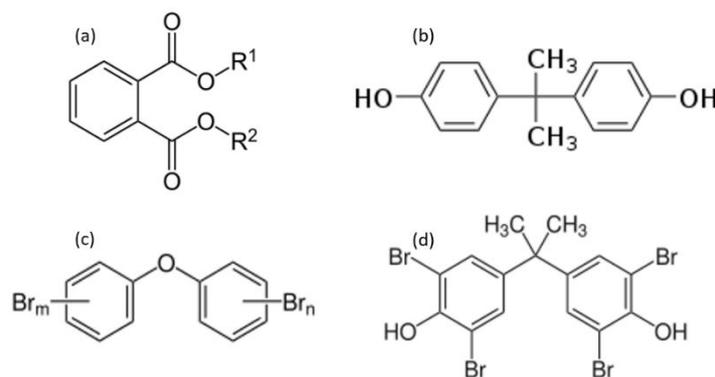


Figure 3. Structure chimique du phtalate (a), du BPA (b), du PBDE (c) et du TBBPA (d)

D'autres composés comme les éléments traces métalliques peuvent poser problème. Par exemple, l'antimoine utilisé comme catalyseur dans la production de bouteille en polyéthylène téréphtalate (PET) peut être relargué par le plastique. Cet élément trace métallique est toxique en réduisant l'activité enzymatique, en altérant les fonctions respiratoires, les processus biochimiques, etc. (Westerhoff *et al.*, 2008).

De plus, les imperfections, la rugosité, la porosité, la taille et l'apparition de biofilms sur les microplastiques et plus particulièrement les microplastiques secondaires vont faciliter l'adsorption de contaminants et leurs transports (Holmes *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2019). Plusieurs types de composés peuvent s'adsorber tels que les éléments traces métalliques, les polychlorobiphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), les antibiotiques... Tous sont rejetés dans les mers et océans par voie marine ou terrestre. Ces

polluants sont toxiques et peuvent être létaux à de très faibles concentrations (OSPAR Commission, 2000).

Toutes ces molécules, qu'elles soient des additifs ou simplement adsorbées sur le plastique, se retrouvent dans le corps des individus qui en ingèrent. Il a été prouvé que le microplastique pouvait passer dans le système circulatoire de moule (Browne *et al.*, 2008). Ce qui veut dire que les effets néfastes atteignent plus d'organes quand ils sont transportés par des microplastiques. De plus, ceux-ci ont tendance à s'accumuler dans les organes augmentant la concentration des polluants et ayant un impact encore plus marqué (Chae *et al.*, 2018).

1.2 La dégradation du plastique en milieu marin

La dégradation du plastique est définie comme étant le changement de propriétés du polymère dû à (i) une altération physique comme des craquelures, des fissures ou même de l'écaillage, (ii) une altération chimique comme la rupture de liaison, l'oxydation et la création de nouvelles molécules ou (iii) une altération biologique étant la minéralisation du polymère par des microorganismes (Pospíšil *et al.*, 1998).

Les principaux processus de dégradation sont la photo-oxydation, l'hydrolyse, la dégradation thermique et la biodégradation. Mais la plupart de ces processus ne sont pas possibles en milieu marin. En effet, les conditions de température basse, la limitation d'apport lumineux ou bien même d'oxygène peuvent empêcher ou ralentir ces phénomènes. Les principales dégradations en milieu marin sont la photo-oxydation, la biodégradation et l'hydrolyse cette dernière étant déjà discutée dans les sections 1.4.1 et 1.4.2 (Andrady, 2015).

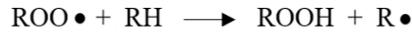
1.2.1 La photo-oxydation

La photo-oxydation est une suite de réaction radicalaire provenant de l'apport énergétique de la lumière. Ce sont les radiations UV proches (290 à 400 nanomètres) qui vont pouvoir déclencher les réactions, car elles ont l'énergie suffisante pour casser les liaisons carbone-carbone (Grigat, 1978).

Initiation :



Propagation :



Terminaison :



Figure 4. Réaction radicalaire de photo-oxydation (Singh & Sharma, 2008)

Ce type de réaction a trois étapes distinctes (Figure 4). La première étape est l'initiation durant laquelle une radiation UV va briser une liaison carbone-carbone ou carbone-hydrogène. Cette étape va créer un radical initial qui est une espèce hautement réactive.

Ensuite, la deuxième étape est la propagation où le radical initial va réagir avec le milieu et notamment l'oxygène. Cette réaction va créer un radical peroxyde qui va lui-même réagir avec la chaîne principale du polymère. Ce radical va arracher un hydrogène et créer un nouveau radical similaire au radical initial ce qui rend la réaction autocatalytique.

Pour finir, des réactions de terminaison ont lieu tout au long de la dégradation et sont essentiellement des réactions entre deux espèces radicalaires qui vont se stabiliser et donc stopper la production de radicaux. Ces réactions vont stopper les réactions en chaîne et donc ralentir la dégradation (Singh & Sharma, 2008).

Ce type de dégradation va casser les longues chaînes du polymère en chaînes plus courtes. Ceci va entraîner une perte des propriétés mécaniques du plastique comme son extensibilité, la résistance aux chocs... (Andrady, 2015).

1.2.2 La biodégradation

La biodégradation est le processus de dégradation effectué par des microorganismes (bactéries, algues, champignons) qui vont transformer le plastique en eau, dioxyde de carbone, méthane et biomasse par le processus de minéralisation (Vert *et al.*, 2012).

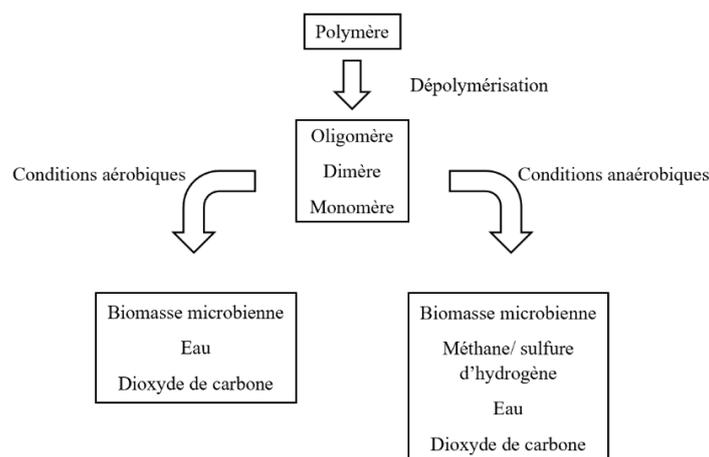


Figure 5. Schéma de la biodégradation de polymère en conditions aérobiques et anaérobiques traduit de (Gu, 2003)

La biodégradation va également dépendre de plusieurs facteurs, notamment la présence d'oxygène ou non. Le fait de passer de conditions aérobiques à anaérobiques va changer les microorganismes qui vont effectuer la dégradation.

La biodégradation va se dérouler en plusieurs étapes, la première étant la formation du biofilm microbien sur le plastique qui est expliqué plus en détail dans la section suivante (1.3). Ce biofilm va permettre de créer un environnement propice à la biodégradation du plastique. En effet, plus les microorganismes sont présents sur le plastique plus ils vont sécréter des enzymes extracellulaires appelées exopolysaccharides (EPS). Cette substance est composée majoritairement de polysaccharides et de protéines. L'EPS va permettre une meilleure adhésion des microorganismes sur la surface et donc améliorer la biodégradation.

La seconde étape est la dépolymérisation. Pour être dégradé, le polymère doit pouvoir passer à travers la membrane cellulaire des microorganismes. Malheureusement, le plastique est formé de polymère bien trop grand et doit tout d'abord subir une dégradation pour atteindre la taille requise. Un mécanisme suggéré pour la dégradation du polyuréthane par les souches *Corynebacterium* est l'excrétion d'enzyme tel que l'uréase, la protéase ou bien même l'estérase capable d'hydrolyser le plastique (Mahajan & Gupta, 2015). Ces enzymes hydrolytiques vont donc jouer un rôle majeur dans la biodégradation du plastique et vont avoir une préférence pour l'hydrolyse au niveau des groupements ester (Barlow *et al.*, 2020). Différents aspects du polymère vont le rendre plus ou moins compliqué à dégrader. En effet, la flexibilité du polymère va lui permettre d'atteindre plus facilement le centre actif des enzymes et donc d'être dégradé. Si le polymère est branché, des gênes stériques peuvent apparaître et empêcher les enzymes d'atteindre les fonctions hydrolysables et bien sûr la présence même de ces fonctions (carbonyle, ester, amide...) va favoriser ou non la biodégradation (Artham & Doble, 2008).

En parallèle de la dépolymérisation, pour passer d'un polymère à des oligomères voir des dimères ou des monomères les processus abiotiques et biotiques entre tous les deux en jeux. La dégradation biologique ou biodétérioration va faire entrer en jeu deux types d'enzymes : les polymérases intracellulaires et extracellulaires. Les polymérases intracellulaires vont dégrader le polymère au milieu de sa chaîne de carbone créant donc des oligomères. Les polymérases extracellulaires vont, quant à elles, briser la chaîne au niveau de ses extrémités créant des monomères ou dimères voir trimères (Lenz, 1993).

Après avoir subi une dépolymérisation, les fragments ayant une longueur de chaîne assez petite pourront passer à travers la membrane semi-perméable des bactéries et être dégradés. Par exemple, le polyéthylène téréphtalate (PET) peut être dégradé par *Pseudomonas mendocina* en acide téréphtalique (TPA) et en éthylène glycol (EG). Des transporteurs TPA peuvent amener le TPA dans le microorganisme où il va être transformé en acide protocatéchique (PCA) pour enfin pouvoir être métabolisé dans le cycle de Krebs. L'EG va quant à lui être métabolisé par le cycle du glyoxylate qui est analogue au cycle de Krebs (Wilkes & Aristilde, 2017).

Ce phénomène est encore plus favorisé lorsque le polymère est proche d'une molécule pouvant être trouvée dans la nature. Par exemple, l'acide polylactique (PLA) est synthétisé à partir d'acide lactique et va donc, en se dégradant, revenir à son monomère. La souche *Saccharothrix* fait partie du groupe actinobactérie connue pour être des producteurs d'antibiotique. Mais cette souche, peu représentée, est également capable de métaboliser l'acide lactique. Quand le PLA est mis en contact avec *Saccharothrix*, celui-ci voit sa biodégradation atteindre les 50% en seulement deux semaines. De plus, le milieu est composé à 80% d'acide lactique à la fin de l'expérience montrant bien l'effet des bactéries *Saccharothrix* (Jarerat *et al*, 2002).

1.3 LA formation de biofilms sur le plastique en milieu marin

Une fois dans le milieu marin, la surface du plastique est rapidement colonisée par un ensemble de microorganismes qui vont former un biofilm. Ce biofilm est un ensemble de composés organiques et inorganiques. Il est notamment composé de bactéries, de champignons, de protozoaires et d'algues qui sont appelés assemblage microbien. Cet assemblage est fixé de manière solide sur le plastique. Il est enfermé dans une matrice de polysaccharides primaires qui sont appelés exopolymères bactériens (Donlan, 2002).

Le début de la formation du biofilm est quasiment instantané. Une fine couche de matière organique et inorganique vient s'adsorber très rapidement sur la surface créant une première couche de conditionnement (Marshall, 1985).

C'est cette étape appelée fixation qui est primordiale pour le développement du biofilm. Cette fixation va être influencée par divers paramètres comme le substrat, l'hydrodynamique et les caractéristiques du milieu aqueux.

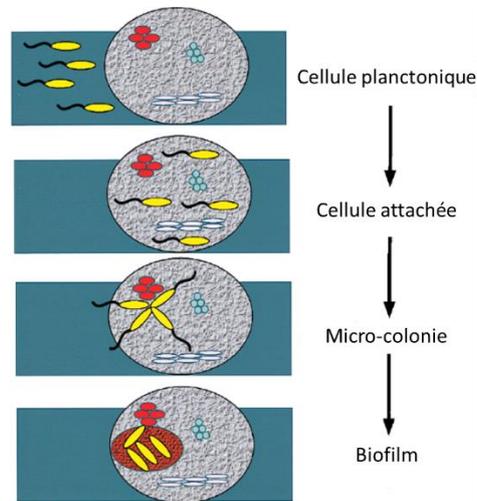


Figure 6. Une représentation schématique des étapes que passe une nouvelle espèce bactérienne pour former un biofilm sur une roche précédemment colonisée par plusieurs espèces de bactéries (ronds rouges, bleus et blancs). Les bactéries jaunes représentent une espèce aquatique qui nage vers la roche à l'aide de flagelles polaires, formant des attaches aléatoires à la roche, migre à la surface pour former une microcolonie et finalement produit un exopolysaccharide (rond orange) pour former un biofilm tridimensionnel. Traduit de (Watnick & Kolter, 2000)

Après la fixation des premiers microorganismes, ceux-ci vont créer des micro-colonies sur le plastique. Ces micro-colonies vont ensuite se développer pour former un biofilm mature (Figure 6). Le seul moyen pour les microorganismes d'intégrer le biofilm est par l'adsorption ou la croissance. Ceci va déterminer si le biofilm se composera d'une couche ou de plusieurs couches de bactéries avec une communauté variée (Watnick & Kolter, 2000).

1.3.1 Le substrat

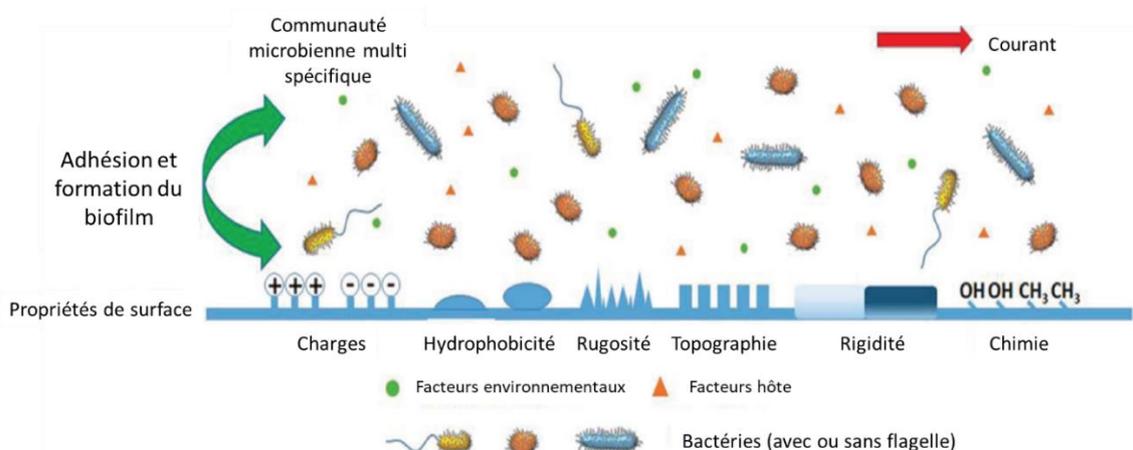


Figure 7. Illustration schématique de l'adhésion bactérienne et des effets des propriétés des matériaux dans des environnements complexes traduits de (Song et al, 2015)

Une corrélation positive a été prouvée entre la rugosité et la topographie d'une surface et la facilité de fixation des microorganismes (Figure 7). Quand le matériel est plus rugueux, la surface de contact est augmentée et donc les possibilités de fixation sont plus grandes. Les forces de friction sont également diminuées, car les microorganismes sont protégés dus à la topographie de la surface (Verran & Boyd, 2001).

L'hydrophobicité du plastique joue également un rôle majeur. En effet, les membranes cellulaires des bactéries sont hydrophobes et peuvent donc créer des interactions hydrophobiques avec le plastique (Pompilio *et al.*, 2008). Ces interactions sont en opposition avec la charge de la surface. En effet, le plastique est un matériau inerte et non chargé, mais certains additifs ou imperfections peuvent créer des charges sur la surface. Celles-ci vont pouvoir créer des interactions avec les microorganismes notamment les bactéries possédant des parois bactériennes gram+ ou gram- vont être attirées ou repoussées par ces charges. Étant donné que la majorité des bactéries sont gram-, les surfaces chargées positivement vont favoriser la formation de biofilm. Pour ce qui est de la rigidité, même si le mécanisme n'est pas encore connu une corrélation négative existe entre l'augmentation de la rigidité et la formation de biofilm. Cette information peut avoir des applications importantes dans le développement de plastiques chirurgicaux, dentaires... (Song *et al.*, 2015)

1.3.2 L'hydrodynamique

L'hydrodynamique joue un rôle primordial dans la fixation des microorganismes. De fait, l'interface substrat/eau a un rôle capital à jouer. Théoriquement, sur l'interface la vitesse de l'eau est nulle et donc les microorganismes peuvent se fixer. Cette petite couche est appelée couche limite. Son épaisseur va varier en fonction des conditions hydrodynamiques du milieu. En effet, si l'eau environnante a une vitesse élevée alors la couche limite sera plus petite (Zheng *et al.*, 1994).

Plus la vitesse est faible plus les bactéries vont avoir du mal à atteindre la surface du plastique, car la couche limite à franchir sera épaisse. Au contraire, si la vitesse est plus forte et entraîne des turbulences alors la couche devient plus fine et la fixation est plus facile. Bien sûr, une limite supérieure existe également pour ne pas arriver au moment où les turbulences sont trop fortes et ont assez d'énergie pour arracher le biofilm (Rijnaarts *et al.*, 1993).

1.3.3 Caractéristique du milieu

Plusieurs paramètres du milieu peuvent varier et influencer la formation du biofilm. La quantité de nutriment disponible est un facteur de croissance. Si la concentration en nutriment est plus

élevée alors le biofilm va avoir une épaisseur plus élevée et une structure moins compacte. Ce changement de structure va avoir un impact sur l'accès aux nutriments de tous les microorganismes composants celui-ci. Si la structure est très compacte, les nutriments ainsi que l'oxygène auront du mal à passer à travers et donc avoir un apport pour les plus éloignés de l'interface biofilm/eau (Melo & Bott, 1997).

La température de l'eau a également un impact très important. L'effet va dépendre des microorganismes en présence. Le biofilm va se développer de manière très importante lorsque la température de l'eau sera semblable à l'optimum de croissance de la bactérie la plus présente. En atteignant cette température, la communauté bactérienne du biofilm peut se développer avec une cinétique optimale (Bott & Pinheiro, 1977).

1.4 Les plastiques biodégradables et non biodégradables

Depuis quelques années, la problématique de la pollution plastique est vraiment devenue une préoccupation mondiale. Ceci a poussé les industries à chercher des solutions comme les plastiques dits biodégradables.

Les plastiques biodégradables sont définis par la norme européenne EN 13432:2000 qui détermine les conditions de biodégradabilité et de compostage pour donner cette appellation à un plastique. La biodégradation est le processus durant lequel des microorganismes (bactéries, champignons, algues) dégradent le plastique et le métabolise en dioxyde de carbone (CO_2), en eau (H_2O), en méthane (CH_4) et en biomasse (Vert *et al.*, 2012), ce processus est expliqué plus en détail dans la section 1.2.2.

Pour pouvoir être considéré comme biodégradable, le plastique doit atteindre des critères de biodégradabilité dans différents environnements naturels (Tableau 1). Ces critères sont basés sur des normes ISO de standards internationaux qui permettent, en suivant leur protocole, de déterminer si le plastique est biodégradable ou non. Certains milieux, comme les eaux douces non traitées n'ont pas de normes. Au contraire, les eaux usées ont bien des normes ISO permettant d'évaluer la biodégradabilité. Pour le milieu marin, il existe deux normes ISO quasi similaires, mais qui évaluent la biodégradation en mesurant la demande biologique en oxygène alors que la seconde mesure l'évolution du CO_2 .

Tableau 1. Tableau des critères des plastiques biodégradables dans trois milieux de dégradation en conditions aérobiques (Harrison *et al.*, 2018)

Norme	Milieu de dégradation	Température	Durée	Critères de validité
ISO 14855-2	Compost industriel	50-60°C	6 mois	90% de biodégradation
ISO 18830:2016 ISO 19679:2016	Environnement marin	15-28°C	1 an	60% de biodégradation
ISO 14851 :2004	Eau usée	20-25°C	56 jours	90% de biodégradation

Les protocoles de ces normes amènent plusieurs problèmes de fiabilité quant à la biodégradabilité du plastique. En effet, les conditions de testing ne sont pas toujours adéquates avec des températures souvent plus élevées qu'en milieu naturel, un milieu contenant des microorganismes présélectionnés et souvent statiques... (Tosin *et al.*, 2012). De plus, un manque de connaissance concernant le lien entre les données produites par ces expériences réalisées dans un laboratoire et le milieu naturel peut également jouer sur la fiabilité. En effet, peu d'études mettent en évidence la biodégradation directement en milieu naturel qui est beaucoup plus variable et avec énormément de paramètres à prendre en compte. Ces tests sont donc généralement réalisés dans des conditions idéales pour la biodégradation et ne représentent pas toujours le processus du milieu naturel qui risque d'être bien plus long (Harrison *et al.*, 2018).

Les plastiques biodégradables ne représentent que 0,35% de la production mondiale de plastique. Les plus produits au monde sont l'acide polylactique (PLA), le polybutylène adipate terephthalate (PBAT), le polybutylène succinate (PBS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA). Ces plastiques sont utilisés dans le textile, l'automobile, l'agriculture... mais c'est dans le domaine des emballages, qu'ils soient rigides ou flexibles, qu'il trouve la plus importante application. (European Bioplastics, 2004). Ces plastiques sont conçus pour répondre aux normes de compostage et leur dégradation en milieu marin est encore peu étudiée. Celui-ci a des températures plus basses et une plus faible concentration en microorganismes que les composts idéaux pour la dégradation des plastiques biodégradables (Figure 8). Une diminution de la dégradation a été mise en évidence par certaines études notamment pour le PLA (Haider *et al.*, 2019).

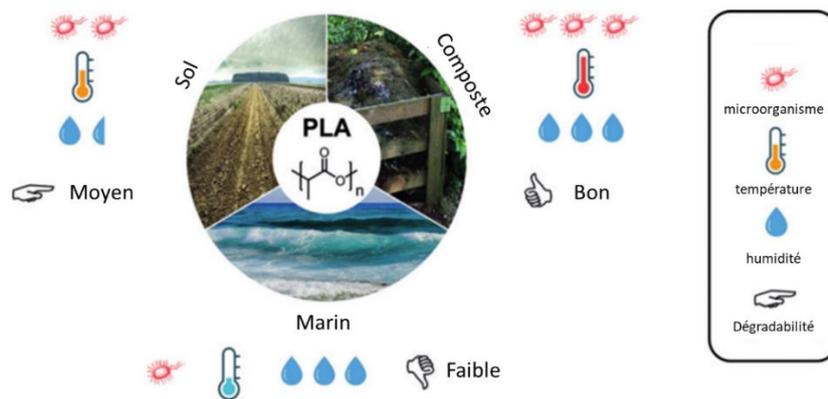


Figure 8. Influence de l'humidité, de la température et de la concentration de microorganismes (appropriés) sur la biodégradation du PLA dans différents environnements. Traduit de (Haider et al., 2019)

À l'opposé de ces plastiques se trouvent donc les plastiques non-biodégradables ne répondant pas à ces normes. Ils sont les plastiques les plus courants et les plus consommés dans le monde. Le polyéthylène à basse densité (LDPE), celui à haute densité (HDPE), le polypropylène (PP), le polychlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS) et le polyéthylène téréphtalate (PET) représentent à eux six plus de 90% de la production mondiale de plastique (Andrady & Neal, M. A., 2009). Ces plastiques ont des applications extrêmement variées comme des films alimentaires, des bouteilles souples, des sachets pour le LDPE et des bouteilles solides, des tuyaux et des jouets pour le HDPE. On passe plutôt à de l'automobile, du mobilier de jardin et des récipients solides pour le PP. Le PVC est quant à lui principalement utilisé dans la construction pour des tuyaux. Le PET est très connu pour l'utilisation de bouteilles plastiques pour l'eau et les sodas ainsi que pour les fibres textiles. Le PS a également des applications variées qui sont expliquées en section 1.4.3 (Li et al, 2016).

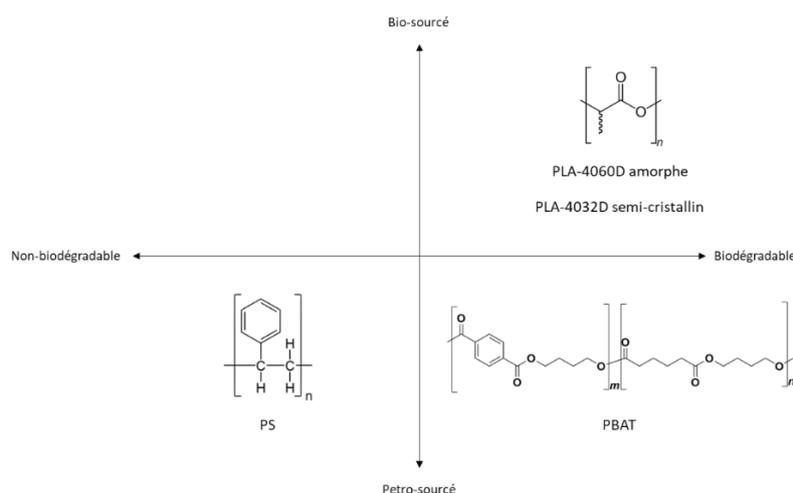


Figure 9. Schéma représentant l'origine et la biodégradabilité de trois types de plastique (PLA, PS et PBAT)

Dans le cadre de ce mémoire nous utilisons trois plastiques différents, un biodégradable biosourcé le PLA sous deux formes différentes (amorphe et semi-cristallin), un biodégradable

pétrosourcé le PBAT ainsi qu'un plastique non biodégradable pétrosourcé, le polystyrène, qui servira de référence (Figure 9).

1.4.1 PBAT

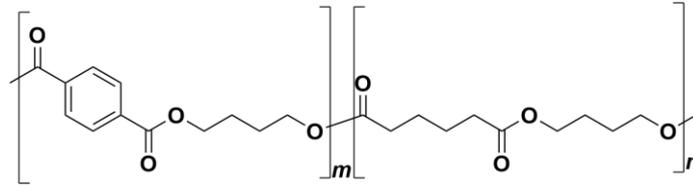


Figure 10. Structure chimique du PBAT

Le polybutylène adipate terephtalate (PBAT) est un copolyester composé d'une partie aliphatique et d'une partie aromatique (Figure 10). La partie aliphatique rend le polymère biodégradable tandis que la partie aromatique va lui donner des propriétés mécaniques intéressantes. L'application principale du PBAT est pour les films plastiques agricoles (pour les serres, l'enrubannage, l'ensilage...), mais aussi une application plus générale dans les emballages alimentaires rigide ou souple (Herrera *et al.*, 2002).

Le PBAT est synthétisé au départ de butane-1,4-diol et d'acide adipique qui va former du poly (adipate de butylène) par polycondensation. La même réaction est réalisée avec du diméthyle téréphtalate (DMT) et le butane-1,4-diol pour former du poly (butylène téréphtalate). Ces deux homo-polyesters formés, une réaction de transestérification est réalisée pour former le copolyester (Zhao *et al.*, 2010).

Le PBAT étant biodégradable, plusieurs études ont analysé la variation de cette dégradation en fonction de l'environnement. Dans les conditions de compostage industriel (58°C, humidité à 50%) le PBAT atteint les 90% de biodégradation en 90 jours (Dammak *et al.*, 2020). Par contre, les études réalisées en milieu marin montrent une biodégradation beaucoup plus lente. Pour une étude d'une durée de 6 semaines avec une eau entre 20°C et 27°C seuls 7-8% du PBAT s'est dégradé (Ren *et al.*, 2019).

En plus de subir une biodégradation, le PBAT peut subir un phénomène d'hydrolyse qui est une réaction qui va rompre une liaison chimique par l'eau.

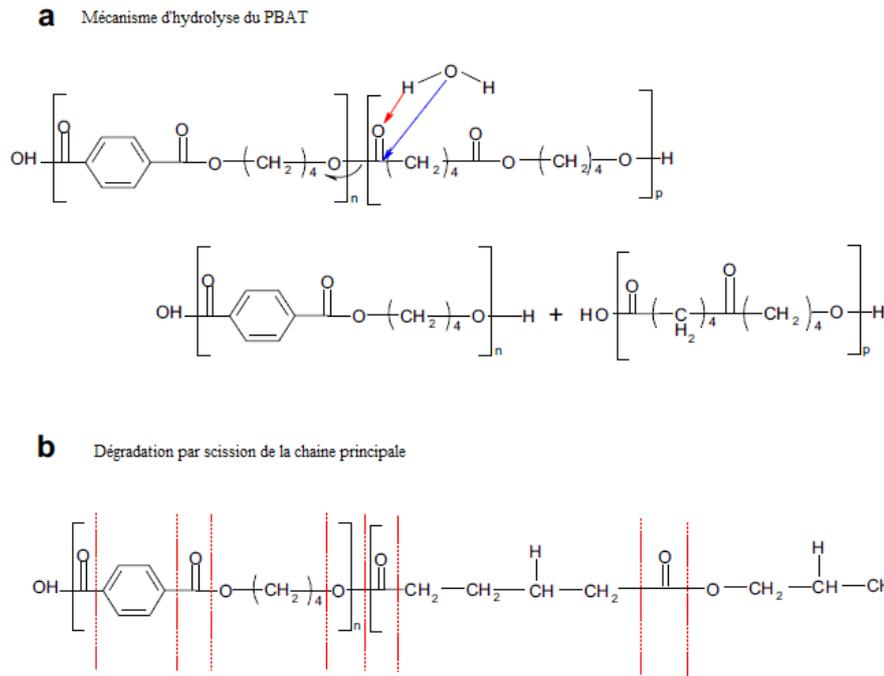


Figure 11. Mécanisme d'hydrolyse du PBAT traduit de (Al-Itry *et al.*, 2012)

L'eau clive la chaîne principale du PBAT au niveau du carbone des esters ou du carbonyle proche du cycle aromatique. Le PBAT hydrolysé va donc voir l'apparition de fonction alcool et carbonyle en bout de chaîne (Figure 11). Cette réaction aura également pour effet de diminuer la taille des chaînes du polymère (Al-Itry *et al.*, 2012).

1.4.2 PLA-4032D et PLA-4060D

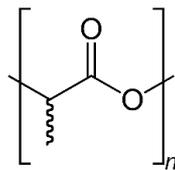


Figure 12. Structure chimique du PLA

L'acide polylactique (PLA) est un polyester biodégradable formé à base d'amidon (Figure 12). Le PLA a un très grand nombre d'applications allant de l'emballage alimentaire aux gaines électriques en passant par les jouets et le matériel médical. La manipulation de la composition stéréochimique du PLA a pour effet de changer ses propriétés physiques comme sa température de fusion ou son taux de cristallinité. Voilà pourquoi les applications du PLA sont si variées. Dans notre cas, ce sont les PLA-4032D et PLA-4060D, respectivement semi-cristallin et amorphe, qui ont été utilisés.

Le composé de base du PLA est l'acide lactique. Il est synthétisé à grande échelle par fermentation de carbohydrate. Les bactéries synthétisant le lactose sont placées en condition anaérobique avec des carbohydrates (glucose, sucrose, amidon...) et des nutriments. L'acide lactique est ensuite séparé et purifié pour la suite du procédé (Sin & Tueen, 2019).

Il existe deux façons de produire du PLA, l'une pour produire du PLA à masse moléculaire faible et l'autre à masse moléculaire élevée.

La première technique consiste en la condensation de l'acide lactique en condition de haute température et basse pression. Le but est de faire réagir les groupements -COOH et -OH de l'acide lactique en enlevant du milieu l'eau qui est un des produits de la réaction. Ce procédé pose problème, car la viscosité du milieu augmente de manière rapide et il devient donc difficile de retirer l'eau. Ceci limite la réaction à de petites chaînes de polymère et donc un poids moléculaire faible. Cette méthode a été améliorée, mais les produits utilisés tels que les solvants pour augmenter le poids moléculaire sont toxiques et dangereux pour l'environnement (Zhang *et al.*, 2009).

La deuxième technique est une polymérisation par ouverture de cycle (POC) qui fait intervenir un intermédiaire appelé lactide. La première étape reste la même avec la polycondensation de l'acide lactique en PLA. Ces oligomères vont être dépolymérisés pour former du lactide, un composé cyclique. En ajoutant un catalyseur, principalement des métaux lourds, ou un changement de solvant vont provoquer une ouverture de cycle du lactide et la polymérisation en PLA (Mehta *et al.*, 2005; Hamad *et al.*, 2018).

Le PLA est aussi compostable et les études s'intéressant à cet aspect le confirment. Comme le PBAT, le PLA atteint les 90% de biodégradation en un peu plus de 90 jours dans des conditions de compostage industriel (Luo, *et al.*, 2019). Plusieurs études ont été réalisées en milieu aqueux pour déterminer la vitesse de biodégradation du PLA, mais la température est toujours plus élevée que les conditions naturelles (entre 37°C et 50°C). Un début de dégradation, dans ces conditions, est visible après un à trois mois en fonction de la température (Benali *et al.*, 2015; Rocca-Smith *et al.*, 2017). De plus, une étude reproduisant les conditions des normes ISO (Tableau 1) en bioréacteur a mis en avant l'incapacité du PLA à se dégrader en milieu marin (Narancic *et al.*, 2018).

Tout comme le PBAT, le PLA subit une réaction d'hydrolyse en contact avec l'eau.

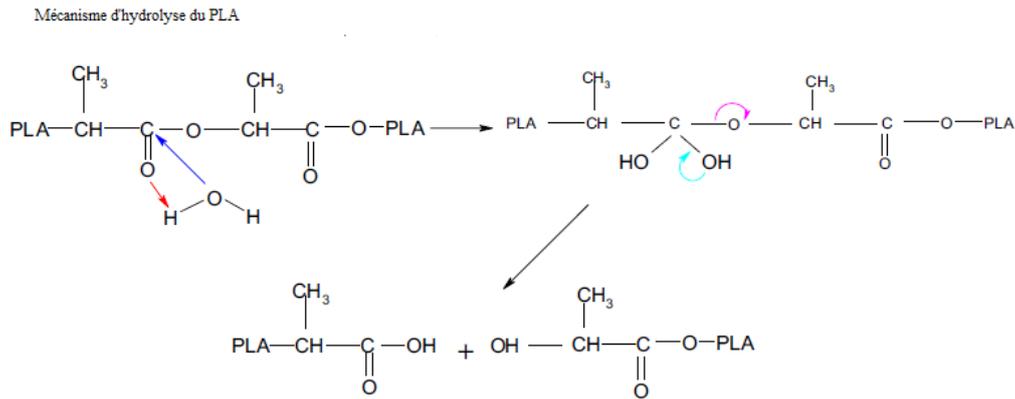


Figure 13. Mécanisme d'hydrolyse du PLA traduit de (Al-Itry *et al.*, 2012)

De nouveau l'eau va réagir au niveau des carbones des esters pour venir casser la liaison C-O. Ceci amène une apparition de groupements carbonyle et alcool en bout de chaîne (Figure 13). De nouveau, la longue chaîne principale va être divisée en plus petites chaînes (Al-Itry *et al.*, 2012).

1.4.3 PS

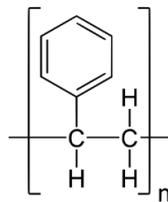


Figure 14. Structure chimique du PS

Le polystyrène (PS) est le polymère obtenu à partir du styrène (Figure 14). Le polystyrène a des propriétés très similaires au PLA et a donc des applications similaires également. Il est utilisé dans l'emballage, les objets à usage domestique et même dans les équipements de réfrigération. Quand le PS est expansé, il sert essentiellement dans la protection contre les chocs durant les transports (Maul *et al.*, 2007). En Belgique, il est dès lors appelé plus communément frigolite.

Le monomère de base du polystyrène est bien sûr le styrène. La production industrielle se fait par réaction radicalaire. Un initiateur va initier la réaction en créant un radical ensuite la propagation est simplement l'ajout d'un monomère en bout de chaîne. La réaction est extrêmement rapide et permet un poids moléculaire important. La terminaison est essentiellement due à des recombinaisons pouvant être contrôlées avec la température (Gao *et al.*, 2004).

2. Objectifs

Le plastique impacte le milieu marin et ses écosystèmes associés depuis le plancton jusqu'au top prédateur, mais nous souffrons d'un manque conséquent d'informations quant à sa biodégradabilité.

Les normes de biodégradabilités étant quasi exclusivement basées sur le compostage industriel ou des conditions idéales de solutions aqueuses en laboratoire, ce mémoire se concentre sur des échantillonnages en bassin dans un aquarium d'eau de mer froide, pour (1) suivre la dégradation du plastique et (2) observer l'évolution des communautés bactériennes se fixant à celui-ci.

De plus, la littérature met en évidence l'impact de paramètres abiotiques tel que la température et les UVs sur la dégradation des plastiques. Des tests supplémentaires sont donc effectués pour mettre en évidence cet impact et appuyer les observations faites sur les plastiques immergés en eau froide.

En analysant les biofilms se développant sur les plastiques, nous cherchons à déterminer si une sélectivité de la communauté bactérienne existe et son évolution au cours du temps en fonction des types de plastique.

Les plastiques étudiés ont été placés dans un bassin de quarantaine d'eau de mer froide à l'Aquarium Museum de l'Université de Liège. Les expériences de dégradation supplémentaires en conditions de températures et d'UV variables ont été mises en place au laboratoire d'Océanologie Biologique de l'Université de Liège. Tous les plastiques ont ensuite été récupérés et analysés dans différents services à l'Université de Mons. Tout d'abord, les plastiques ont été analysés par différentes techniques chimiques (ATR-FTIR, DSC et GPC) au laboratoire de Matériaux Polymères et Composites. Ensuite, une analyse des biofilms par extraction d'ADN, suivie d'une PCR et d'une DGGE a été réalisée au laboratoire de Protéomique et Microbiologie.

3. Matériel et méthodes

3.1 Presse des plastiques

Les trois plastiques biodégradables sont préparés à partir de granules pour éviter tout additif et travailler sur le plastique pur. Chaque film pressé a un diamètre de 5 centimètres et une épaisseur de 200 microns et est préparé en pesant 0,6 grammes de granules.

Le PBAT est pressé à partir de granules de PBAT, ECOFLEX F Blend C 1200 fourni par la société BASF et distribué par la société B-PLAST2000 en Allemagne. Les conditions de presse sont les suivantes :

- 150°C
- 3 minutes de préchauffage sans pression
- 3 minutes de pression
- 2 dégazages
- 2 minutes de haute pression
- 5 minutes de refroidissement

Le PLA semi-cristallin et le PLA amorphe sont préparés à partir de PLA-4032D et PLA-4060D, respectivement, fournis par la société Nature Works (USA). Les conditions de presse sont les suivantes :

- 200°C
- 5 minutes de préchauffage sans pression
- Mise en basse pression + 2 dégazages
- 2 minutes à haute pression
- 5 minutes de refroidissement

Les films plastiques sont ensuite placés dans des sachets à l'abri de l'humidité et de la lumière pour éviter une dégradation par les UV.

3.2 Dispositif expérimental de l'aquarium

Les plastiques ont été prélevés à trois moments différents 3, 5 et 8 mois (voir Annexe 1). Pour chaque prélèvement quatre répliques pour chaque type de plastique ont été immergés ce qui donne un total de 16 films. Chaque film de plastique est percé de trous pour y passer des colsons qui vont permettre de les fixer à un cadre. Les films sont pesés avant d'être fixés et un code couleur est donné aux colsons pour pouvoir les reconnaître :

- Bleu : PS
- Vert : PLA-4032D
- Jaune : PLA-4060D
- Rouge : PBAT



Figure 15. Cadre de plastique placé à l'aquarium

Chaque type de plastique est placé de manière différente de chaque côté du cadre pour éviter que l'ordre du placement n'influence la dégradation (Figure 15). Trois cadres sont donc préparés, chacun correspondant à un temps de prélèvement, avec un total de 48 films plastiques. Les cadres finis, ils sont aspergés d'éthanol 70% puis sont séchés pour désinfecter les plastiques avant leur immersion.

Les trois cadres ont été installés à l'Aquarium-Muséum Universitaire de Liège dans un bassin de quarantaine. Ce bassin n'est pas disponible à la vue du public et sert en cas de mise en quarantaine d'individu pour des soins ou autre. Le bassin est relié au circuit de filtration de tous les bassins de « mer froide ».

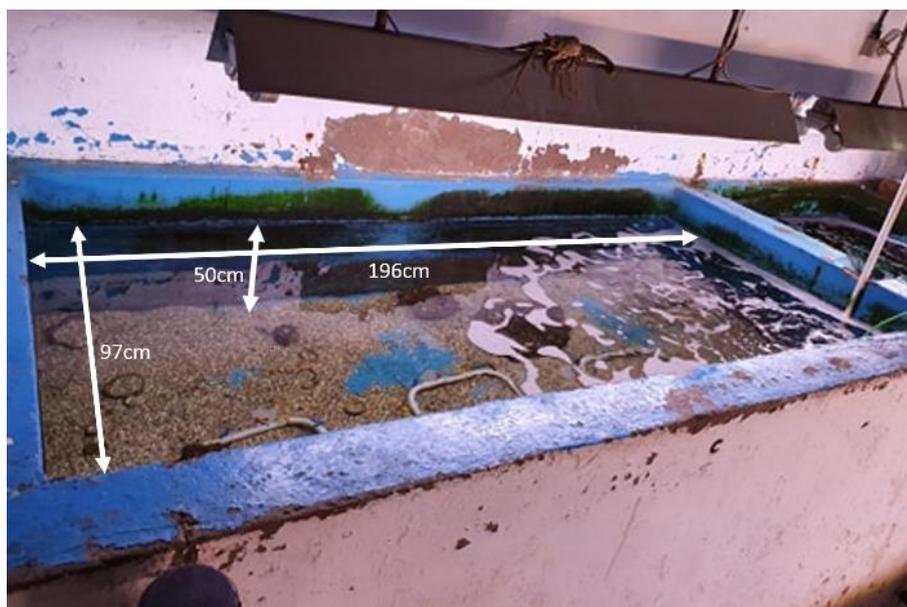


Figure 16. Bassin de quarantaine d'eau froide de l'Aquarium-Muséum de Liège où sont placés les trois cadres de plastique

Le bassin a une température d'eau variant de 14°C à 20°C qui suit le cycle été-hiver dans l'hémisphère nord. Le bassin mesure 97 centimètres de large pour 196 centimètres de long et 50 centimètres de hauteur d'eau (Figure 16). Les cadres sont placés au niveau du sédiment et un HOBO est fixé au cadre du dernier prélèvement. Ce HOBO enregistre les données de température et de luminosité toutes les 6 heures pendant les 7 mois d'immersion.

3.3 Récupération du biofilm

Les plastiques sont prélevés et placés dans des pots remplis d'eau du bassin et conservés à une température de 4°C pour éviter un développement du biofilm durant le transport. Toute intervention se déroule ensuite sous hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination. Les films sont manipulés avec une pince et sont rincés à l'eau de mer artificielle stérile d'une salinité de 38 [la salinité s'exprime sans unité normalement, mais ici vu qu'elle est artificielle je ne sais pas si ça change quelque chose, on peut en parler la prochaine fois]. Ce rinçage permet d'éliminer les microorganismes qui ne sont pas correctement attachés au biofilm. Le plastique est ensuite placé dans un récipient propre et sec. Deux millilitres d'eau de mer artificielle y sont ajoutés et le biofilm est gratté à l'aide d'un scalpel en plastique stérile afin de récupérer un maximum de biofilm sans abraser la surface du plastique. Cette opération est répétée deux fois pour récupérer un total de 4 millilitres de biofilm en solution. La solution est ensuite placée dans deux Eppendorf de 2 millilitres.

Ces solutions sont centrifugées à 14000 tours/minutes durant 10 minutes. Le surnageant est ensuite retiré pour ne laisser que les culots de biofilms qui seront placés au congélateur à -40°C.

3.4 Analyses chimiques

3.4.1 Méthode de perte de poids

Les films plastiques sont nettoyés à l'éthanol et à l'eau désionisée puis séchés à l'étuve à 30°C pendant au moins deux jours. Chaque film est ensuite pesé à la balance analytique pour pouvoir calculer une différence de poids avant/après immersion (Roy *et al.*, 2008).

$$\text{Perte de poids (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Où m_i est le poids du plastique au temps initial et m_f , le poids du polymère après l'immersion dans le milieu marin.

3.4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflectance totale atténuée

La dégradation a été analysée grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en utilisant la technique de la réflectance totale atténuée (ATR). La machine utilisée est le Bruker Tensor 27 avec le logiciel OPUS 6.5. Chaque spectre a un total de 32 scans allant de 4000 à 600 cm^{-1} . En plus des échantillons immergés, un film plastique au temps initial (t_i), n'ayant pas été immergé, est analysé pour pouvoir effectuer une comparaison et observer de potentiels changements. Un background est pris régulièrement tout au long de l'analyse pour avoir une ligne de base correcte. L'emplacement des échantillons est également lavé à l'éthanol pour éviter toute contamination.

3.4.3 Calorimétrie différentielle à balayage

La technique de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est utilisée pour analyser différents paramètres du plastique. L'appareil utilisé est le DSC Q2000 de chez TA instruments.

Chaque échantillon est analysé en coupant entre 5 et 10 milligrammes de plastique qui sont placés dans une nacelle standard. Les nacelles sont ensuite placées dans la DSC pour être analysées avec des cycles de chauffe différents.

La méthode est appelée Heat/Cool/Heat qui se compose de trois cycles de température

Pour le PLA-4032D et PLA-4060D :

1. Début à $-20^{\circ}C$
2. Rampe de $10^{\circ}C/minutes$ jusque $200^{\circ}C$
3. Fin du cycle 1
4. Isotherme pendant une minute
5. Rampe de $10^{\circ}C/minute$ jusque $-20^{\circ}C$
6. Fin du cycle 2
7. Isotherme pendant une minute
8. Rampe de $10^{\circ}C/minute$ jusque $200^{\circ}C$
9. Fin du cycle 3

Pour le PBAT et le PS

1. Début à $-80^{\circ}C$
2. Rampe de $10^{\circ}C/minute$ jusque $200^{\circ}C$
3. Fin cycle 1
4. Isotherme une minute
5. Rampe de $10^{\circ}C/minute$ jusque $-80^{\circ}C$
6. Fin cycle 2
7. Isotherme une minute
8. Rampe de $10^{\circ}C/minute$ jusque $200^{\circ}C$
9. Fin cycle 3

Chaque échantillon est analysé et, comme pour l'ATR-FTIR, un plastique de chaque type non immergé (t_i) est utilisé comme référence.

Toutes les données sont ensuite analysées grâce au programme TA Universal Analysis. Les paramètres analysés sont la température de transition vitreuse (T_g), la température de

cristallisation à froid (T_{cc}), la température de fusion (T_m) ainsi que l'enthalpie de cristallisation (ΔH_{cc}), l'enthalpie de fusion (ΔH_m) et le pourcentage de cristallinité ($\chi^c(\%)$) dont l'équation s'écrit (Benali *et al.*, 2015):

$$\chi^c (\%) = \left[\frac{\Delta H_{m(t)} - \Delta H_{c(t)}}{\Delta H_m^0} \right] \times 100$$

3.4.4 Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (GPC) est la dernière technique chimique utilisée pour la caractérisation du plastique dans le cadre de ce mémoire.

Pour la préparation de chaque échantillon, il faut peser 10 milligrammes de plastique qui sont déposés dans un vial en verre. Dans ce vial, 5 millilitres de chloroforme spécifique à la GPC sont ajoutés pour dissoudre le plastique. L'échantillon est légèrement chauffé pour accélérer le processus. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue avec un filtre de nylon de 0,4 micromètres pour éliminer toutes les impuretés et placée dans les flacons à GPC.

Tout comme les techniques précédentes, un film de chaque type de plastique non immergé (t_i) est utilisé comme référence et analysé en triplicata. L'appareil utilisé est un chromatographe liquide Agilent. L'échantillon est injecté avec un auto-échantillonneur Agilent à une vitesse de 1mL/min. la calibration a été effectuée avec le standard PS pour la séparation des masses molaires moyenne en masse variant de 200 à 4.10^5 g/mol (Bastarrachea *et al.*, 2010). Cinq paramètres sont pris en compte, la masse molaire moyenne en nombre (m_n), la masse molaire moyenne en masse (m_w), la dispersité (D) et la masse molaire au maximum du pic (m_p).

3.5 Analyses microbiologiques

3.5.1 Extraction d'ADN

Les culots préalablement récupérés (voir section 2.3) sont utilisés pour extraire l'ADN grâce au kit DNeasy® PowerSoil®. L'extraction a été réalisée en suivant la démarche préconisée par le fabricant.

Chaque échantillon est ensuite analysé pour réaliser un dosage de l'ADN. Pour cela les échantillons sont préparés à l'aide du kit Qubit et sont analysés grâce au Qubit 4 Fluorometer. Chaque concentration en ADN est reprise en nanogramme par microlitre.

L'ADN purifié est conservé dans des Eppendorf au congélateur à -40°C en attendant les prochaines manipulations.

3.5.2 Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant

Une réaction en chaîne par polymérase (PCR) est réalisée afin d'amplifier un fragment de 200 paires de base du gène codant pour l'ARN 16S des différentes bactéries. C'est une touchdown PCR, c'est-à-dire qu'elle est effectuée à une température d'hybridation qui diminue progressivement, mais qui commence à une température élevée pour avoir uniquement des amplifications spécifiques.

Toutes les manipulations s'effectuent sous hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination de l'ADN, car des amorces universelles sont utilisées. Les échantillons sont dilués avec de l'eau PCR pour arriver à une concentration de 2ng/μl afin de réaliser la PCR.

Cette PCR est réalisée à l'aide de Red'y Star Mix et des amorces universelles : 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') et GM5F-C12 (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Gillan *et al.*, 2005).

Tableau 2. Volume des réactifs en microlitre pour effectuer la touchdown PCR de la DGGE d'un échantillon

	Pour un échantillon (μl)
Red'y Star Mix	25
Amorce 518R	0.5
Amorce GM5F-C12	0.5
Eau	23
ADN (2ng/μl)	1

Chaque échantillon est préparé sur une plaque PCR en y ajoutant chaque réactif (Tableau 2).

La PCR suit le cycle suivant :

10 minutes à 95°C pour activer la Taq polymérase HotGold start contenue dans le Red'y Star Mix

20 fois le cycle suivant :

- 94°C pendant 30 secondes (dénaturation)
- 65°C pendant 45 secondes (avec diminution de 0,5°C à chaque cycle) (hybridation)
- 72°C pendant 30 secondes (élongation)

10 fois le cycle suivant :

- 94°C pendant 30 secondes (dénaturation)
- 55°C pendant 45 secondes (hybridation)

- 72°C pendant 30 secondes (élongation)

10 minutes à 72°C pour terminer la PCR

Pour vérifier si la PCR a bien fonctionné une analyse électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% contenant 20µl de gel red. Les échantillons sont ensuite conservés au congélateur à -40°C.

Ensuite, une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) est réalisée. Le gel comporte un gradient de dénaturant faible en haut et plus concentré en bas. Les dénaturants sont l'urée et le formamide. L'ADN migre dans le gel jusqu'à ce qu'il soit totalement dénaturé. Plus l'ADN contient de paires de bases GC plus il migrera loin dans le gel. Dans notre cas, c'est donc un gène de 200 paires de bases de l'ARN 16S répliqué juste avant qui sera analysé. Le gradient utilisé est de 25–75 % (v/v) de dénaturants. Le gel comportait aussi du tampon Tris, Acétate, EDTA (TAE) 0,5% (v/v) et 10 % d'acrylamide (v/v). Enfin, de l'Ammonium PerSulfate (APS) à 0,2 % final(w/v) et du Temed à 0,1% final (v/v) ont été utilisés pour polymériser le gel. Le gradient du gel a été réalisé avec à un tube en U de type Gradient Former Model 385 BIO-RAD et avec une pompe péristaltique ISMATEC ® à 0,170 mL/ min. Ensuite, le gel est placé dans la cuve BIO RAD DcodeTMet 40 µL des échantillons de PCR ont été placés dans les puits. La migration a été réalisée dans du tampon TAE 0,5% (v/v) pendant 16 h à 60°C et à 75 Volts. Le gel est ensuite coloré dans une solution contenant 0,005% de Gel Red (v/v). Le gel est ensuite visualisé et photographié sous lampe UV.

3.6 Dispositif expérimental de l'expérience de température et d'exposition UV

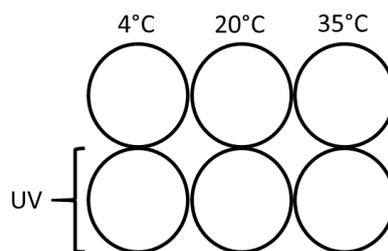


Figure 17. Schéma du dispositif expérimental, chaque rond représente une boîte contenant chaque type de plastique en quatre répliques

Chaque film plastique est coupé en quatre pour récupérer des morceaux plus petits et plus faciles à utiliser dans le cadre de cette expérience.

Les plastiques sont placés dans des boîtes en plastique de 30 centimètres sur 40 centimètres avec une hauteur d'eau de 4 centimètres. Chaque boîte contient quatre répliques de chaque type de plastique donc au total 16 morceaux de films plastique. Les paramètres de température et

d'exposition UV sont différents pour chaque boîte (Figure 17). Les boîtes sont remplies d'eau de mer artificielle de salinité 38 préparée à partir de Sea salt de chez Sigma-Aldrich.

Trois températures sont utilisées pour montrer l'impact de ce paramètre sur la dégradation. La première est de 4°C, pour cela les boîtes sont placées en chambre froide. La deuxième est une température de 20°C, les boîtes sont donc simplement placées à température ambiante. La dernière température est de 35°C, pour l'atteindre une résistance à aquarium, Smart Heater 100W de chez SuperFish, est utilisée pour chauffer l'eau.

Pour chaque température, une boîte est plongée dans le noir pour éviter tout apport de lumière et la seconde est placée sous une lampe à fort rayonnement UVA et UVB, JBL reptildesert uv 300 15W (voir Annexe 2).

Les plastiques sont récupérés après deux mois d'immersion et analysés par les techniques chimiques présentées à la section 3.4.

3.7 Analyse statistique des données

Les données recueillies sont analysées grâce au programme R (V3.5.2 : R Core Team). Les données de chaque prélèvement sont analysées par t-test pour déterminer si une différence significative existe entre les types de plastique. Les valeurs sont jugées significativement différentes lorsque la p-value est inférieur à 0,05.

4. Résultats

4.1 Analyses chimiques

Après avoir récupéré le biofilm sur les plastiques, les avoir nettoyés à l'éthanol et à l'eau désionisée et les laisser sécher, chacun est pris en photo pour avoir une comparaison visuelle. En effet, en se dégradant les plastiques peuvent avoir un changement d'aspect, de couleur, de texture... Le PLA, normalement transparent, devient opaque quand il commence à être dégradé (Benali *et al.*, 2015). Pour tous les plastiques immergés à l'aquarium, aucun changement visuel n'est constaté durant les huit mois d'immersion (voir Annexe 3).

Pour les expériences de température et d'UV, une évolution de l'aspect des plastiques est visible (Figure 18). Le PS ainsi que les PLA sont de couleur blanchâtre et plus opaque à 35°C. Aucun changement n'est visible pour le PBAT. De plus, les PLA immergés à 4°C étaient plus friables et cassants que ceux à 20°C et 35°C. Ceci les a rendus fragiles au niveau du trou créé pour pouvoir différencier les différents répliques.

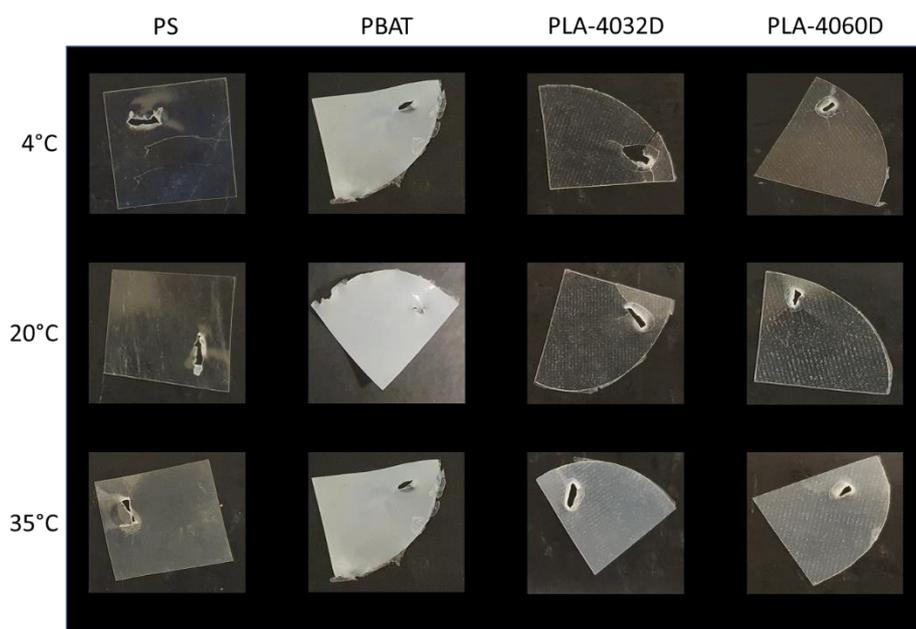


Figure 18. Photos des films plastiques de PS, PBAT, PLA-4032D (semi-cristallin) et PLA-4060D (amorphe) après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C) sous exposition d'une lampe UV

4.1.1 Perte de poids

Chaque plastique a été pesé à la balance analytique avant et après immersion dans le milieu marin pour pouvoir déterminer une éventuelle perte de poids. Celle-ci permet de mettre en évidence une éventuelle dégradation du plastique. La température ainsi que la luminosité ont également été suivies durant toute la durée de l'expérience afin de pouvoir connaître au mieux

leurs variations et les comparés aux conditions d'expériences retrouvées dans la littérature (voir Annexe 4). Celle-ci varie entre 14°C et 20°C avec une température moyenne de 17°C.

Le pourcentage de perte de poids est calculé à partir de quatre répliques et représente une moyenne à chaque temps de prélèvement.

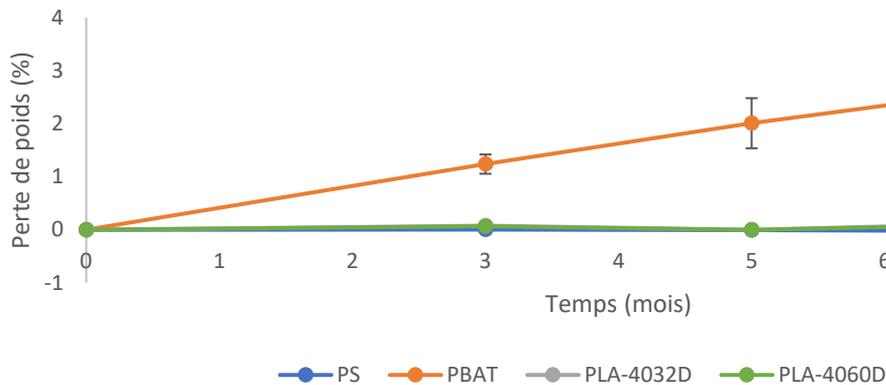


Figure 19. Evolution de la perte de poids du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

Pour l'expérience menée à l'aquarium (Figure 19), la perte de poids du PS reste aux alentours de 0% même après huit mois d'immersion où elle atteint $-0.0367 \pm 0.0408\%$. Cette perte de poids négative s'explique par la précision de la balance analytique utilisée. Aucune perte de poids n'est donc constatée pour le PS. Pour le PLA-4032D et le PLA-4060D, aucune perte de poids n'est notable après cinq mois et elle atteint $0.1875 \pm 0.0241\%$ et $0.1517 \pm 0.0120\%$ respectivement après les huit mois d'immersion. Le PBAT, quant à lui, a une perte de poids dès trois mois d'immersion en commençant à $1.2375 \pm 0.1816\%$ pour atteindre les $3.0022 \pm 0.4888\%$ après huit mois.

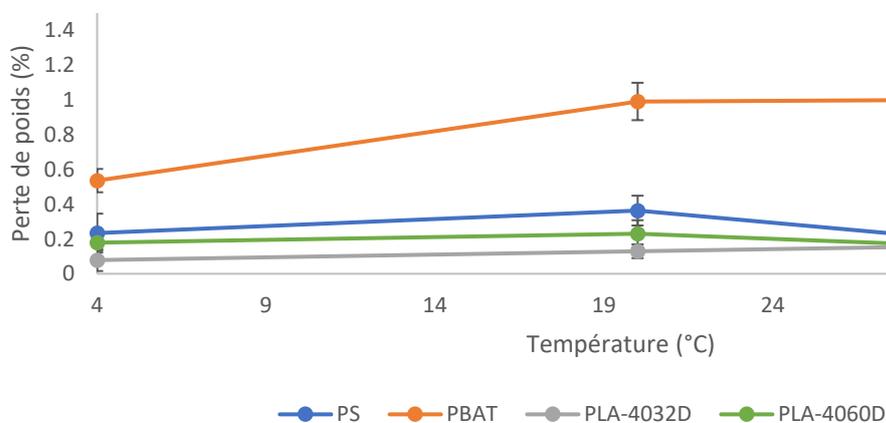


Figure 20. Evolution de la perte de poids du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à 4°C, 20°C et 35°C

Une expérience en laboratoire a également été menée en immergeant les plastiques dans de l'eau de mer artificielle à trois températures différentes (4°C, 20°C, 35°C) avec présence ou non d'UV pour mettre en évidence l'impact de ces paramètres abiotiques sur la dégradation. Les pertes de poids pour l'expérience sans UV sont présentées à la Figure 20. Celles-ci restent quasiment nulles pour le PS et les PLA. Avec un maximum de perte de $0.3636 \pm 0.0857\%$ pour le PS à une température de 20°C. Le PLA-4032D a lui des valeurs restant proche de 0.1000% avec un maximum à $0.1761 \pm 0.0318\%$ à 35°C. Le PLA-4060D a une perte de poids légèrement supérieure tournant aux alentours des 0.2000%, mais son maximum est à $0.1791 \pm 0.0447\%$ à une température de 4°C. Le PBAT est celui avec la perte de poids la plus importante qui augmente avec la température. En effet, la perte de poids à 4°C est de $0.5361 \pm 0.0672\%$ et monte à $1.0061 \pm 0.0628\%$ à 35°C.

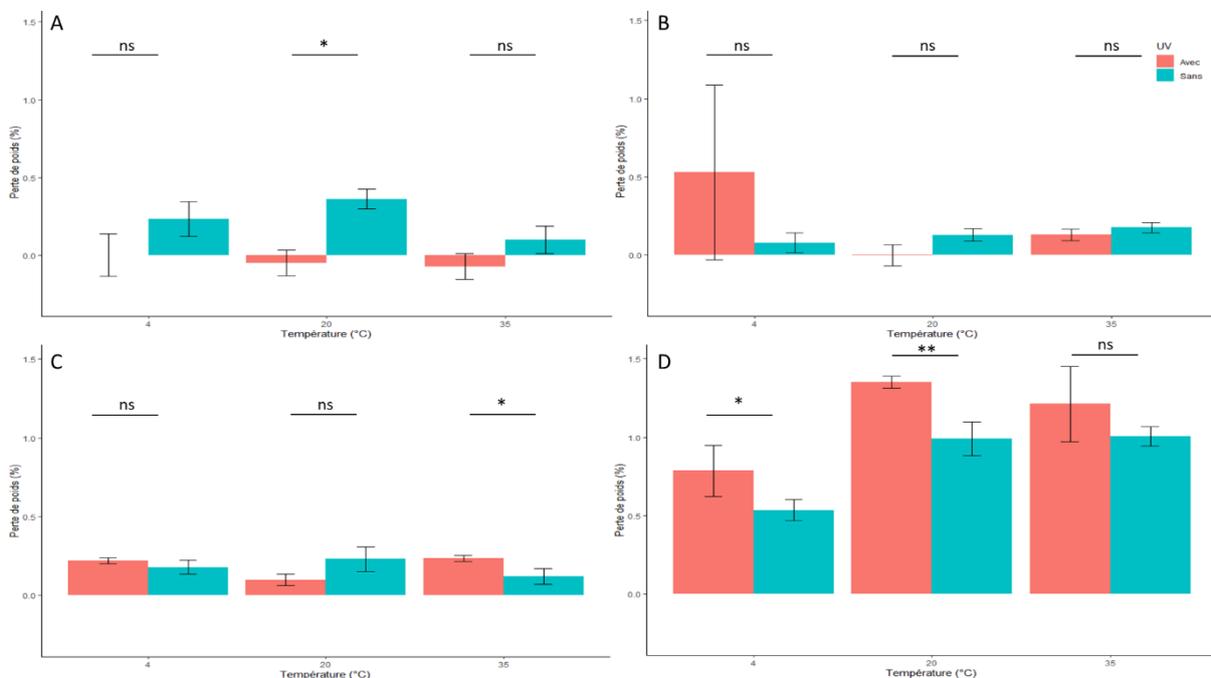


Figure 21. Perte de poids du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C) et du PBAT (D) après deux mois d'immersion en milieu marin artificiel à 4°C, 20°C et 35°C avec exposition à une lampe UV (orange) ou non (bleu). T-test non-apparié ; ns, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

La perte de poids avec une exposition aux UVs est comparée à celle des plastiques sans exposition (Figure 21). La perte de poids du PS reste quasiment nulle. Aucune différence significative n'est observée entre les plastiques exposés aux UVs ou non, excepté pour les plastiques immergés à 20°C où la perte de poids sans exposition UV est significativement plus élevée (Figure 21A). Les pertes de poids négatives du PS sont dues à la précision de la balance et peuvent être égalées à zéro. Les PLA ont des pertes de poids très similaires proches des 0,2%. La perte de poids la plus élevée du PLA-4032D est à 4°C avec $0,5291 \pm 0,5591\%$. Encore une

fois aucune différence significative n'existe entre les plastiques exposés ou non à l'exception du PLA-4060D à 35°C. celui-ci a une perte de poids significativement plus haute en étant exposé aux UV. Pour finir, le PBAT est toujours celui avec la perte de poids la plus élevée avec un maximum sous exposition UV à 20°C avec $1,3552 \pm 0,0372\%$. La perte de poids est significativement plus haute avec une exposition UV sauf à 35°C (Figure 21D).

4.1.2 ATR-FTIR

Les plastiques de l'aquarium ont ensuite été chacun analysés par ATR-FTIR. Cette technique permet de mettre en évidence des groupements fonctionnels de surface du polymère en les amenant dans un état de transition vibrationnel caractérisé par une longueur d'onde dans l'infrarouge. Si un polymère subit une dégradation, de nouvelles fonctions apparaissent dans le polymère et de nouveaux pics apparaissent sur les spectres ATR-FTIR. On peut donc mettre en évidence une évolution de la dégradation du plastique en analysant des spectres aux différents temps d'immersion.

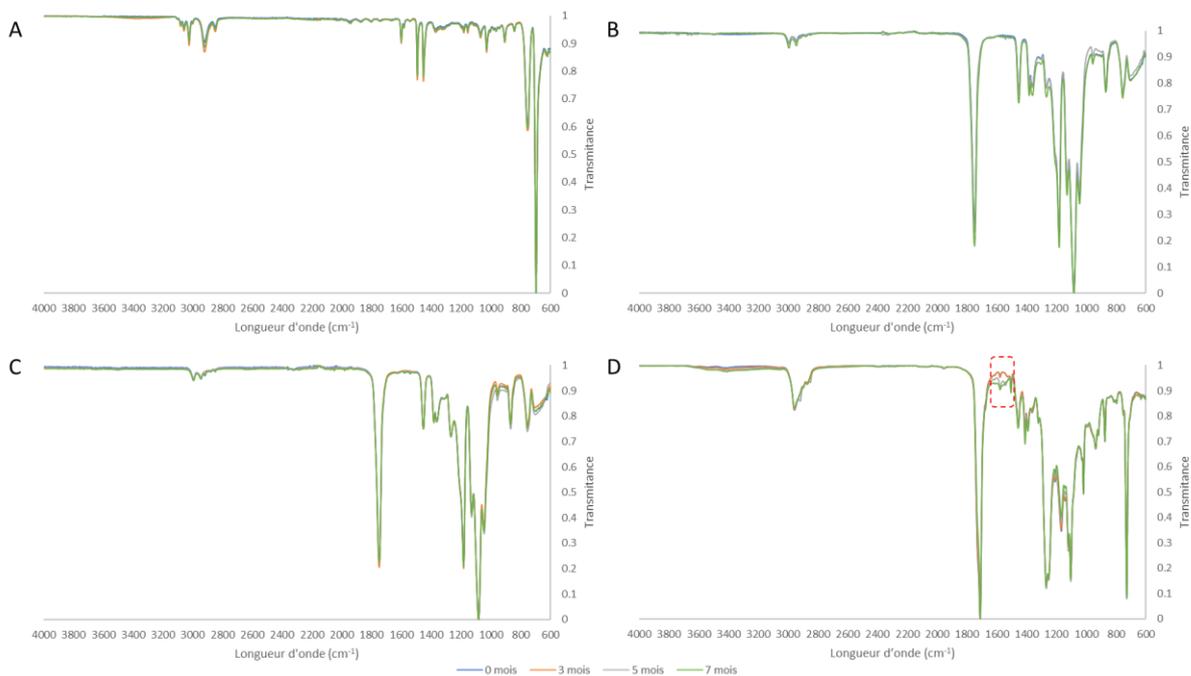


Figure 22. Spectre ATR-FTIR normalisés du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C), PBAT (D) sans immersion (t_i) et après 3, 5 et 8 mois d'immersion dans un milieu marin. L'encadré rouge met en évidence l'apparition de pic.

Les spectres ATR-FTIR de l'aquarium (Figure 22) ne montrent aucune différence entre les plastiques non immergés (t_i) et ceux ayant passé 3, 5 et 7 mois en milieu marin pour le PLA-4032D, le PLA-4060D et le PS. Le PBAT, quant à lui, a un pic apparaissant à environ 1600 cm^{-1} pour le spectre correspondant aux huit mois d'immersion. Une très légère apparition d'un pic large à 3500 cm^{-1} est également visible sur les spectres de cinq et huit mois d'immersion.

Pour limiter le nombre d'analyses à réaliser, les plastiques des expériences de températures et d'UV ont dû être sélectionnés. Seuls les plastiques immergés à différentes températures et exposés à une lampe UV ont été analysés. Ce choix a été fait pour avoir une vue d'ensemble sur l'impact de ces deux paramètres.

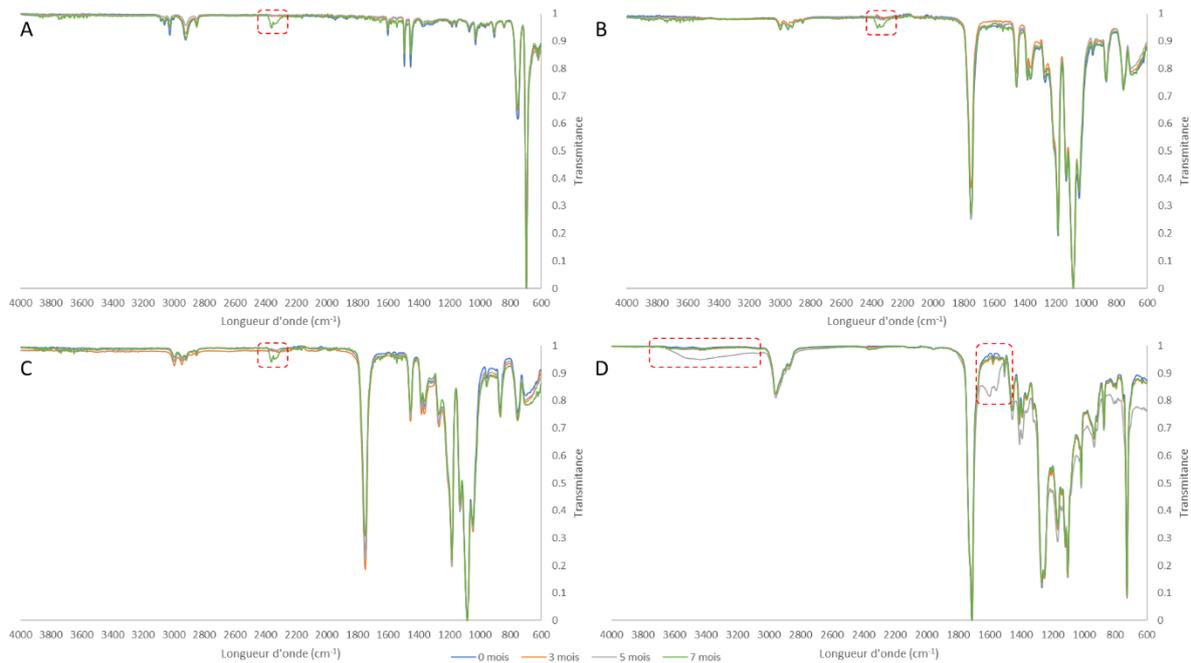


Figure 23. Spectre ATR-FTIR normalisés du PS (A), PLA-4032D (B), PLA-4060D (C), PBAT (D) non immergé (Ti) et après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C, 35°C) et sous lampe UV. Les encadrés rouges mettent en évidence l'apparition de pics

Les spectres ATR-FTIR des PLA et du PS ont une apparition d'un pic à 2300 cm^{-1} à une température de 35°C , mais reste inchangés aux autres températures (Figure 23). Le PBAT, quant à lui, a un pic large apparaissant entre 3600 et 3200 cm^{-1} et une autre à 1600 cm^{-1} à une température de 20°C . Aucun pic n'apparaît aux autres températures.

4.1.3 GPC

La GPC est une technique de chromatographie en phase liquide. Celle-ci se base sur le principe de volume hydrodynamique des polymères. En effet, dissout dans un solvant, chaque polymère va occuper un certain volume en fonction de son affinité avec celui-ci. Les polymères en solution sont injectés sur une colonne qui va permettre de les séparer. Les polymères prenant les plus grands volumes vont passer directement à travers la colonne tandis que les plus petits vont prendre plus de temps.

Comme pour la perte de poids, les valeurs des données exprimées sont la moyenne des quatre répliques de chaque type de plastique. Les paramètres les plus pertinents concernant la

dégradation du plastique sont la masse molaire moyenne en nombre (M_n) et la dispersité (D_M). La première représentant la masse molaire d'une chaîne de longueur moyenne et la deuxième étant l'homogénéité du polymère. Un polymère parfait ayant des chaînes de même longueur avec la même masse molaire aura une dispersité de 1. Les valeurs de ces paramètres sont reprises dans le Tableau 3.

Tableau 3. Paramètres GPC de la masse molaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) et de la dispersité (D_M) pour des plastiques sans immersion (t_i), et après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

Polymère	Echantillons	\overline{M}_n (g/mol) ¹	D_M ²
PLA (4032D)	t_i	138 323	1.7
	3 mois	137 520	1.7
	5 mois	164 842	1.6
	8 mois	214 917	1.7
PLA (4060D)	t_i	133 783	1.7
	3 mois	126 572	1.7
	5 mois	148 255	1.7
	8 mois	194 500	1.6
PBAT	t_i	52 093	2.4
	3 mois	54 826	2.4
	5 mois	53 654	2.5
	8 mois	63 223	2.6
PS	t_i	133 810	2.6
	3 mois	141 330	2.5
	5 mois	141 040	2.6
	8 mois	186 620	2.8

Toutes les courbes GPC des plastiques de l'aquarium ont une distribution monomodale (Voir Annexe 5). L'évolution de la dispersité après huit mois d'immersion ne varie quasiment pas pour les deux types de PLA. Nous observons une légère augmentation pour le PS et le PBAT de l'ordre de 0.2 (Figure 24B). Pour ce qui est de la masse molaire, une augmentation est visible pour tous les plastiques. Elle est la plus faible pour le PBAT avec $\pm 11\ 000$ g/mol de différence après huit mois d'immersion. Le PLA-4032D a quant à lui l'augmentation la plus forte avec $\pm 75\ 000$ g/mol après 7 mois.

$$^1 \overline{M}_n(\text{g/mol}) = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

$$^2 D_M = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$$

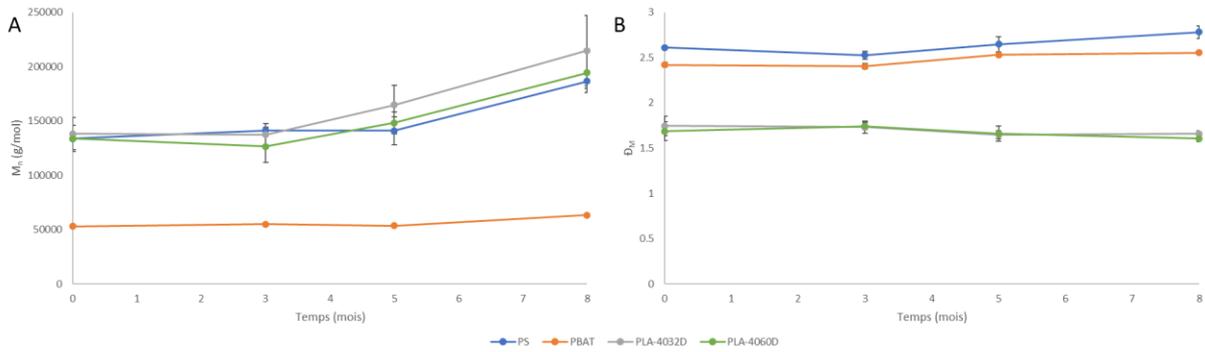


Figure 24. Evolution de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de la dispersité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et PLA-4060D après 0, 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu

Encore une fois, seuls les plastiques immergés à différentes températures et exposés sous UV sont analysés par GPC. Les valeurs de masse molaire en nombre et de dispersité aux différentes températures sont comparées aux valeurs sans immersion et représentées par les droites en pointillés sur la Figure 25.

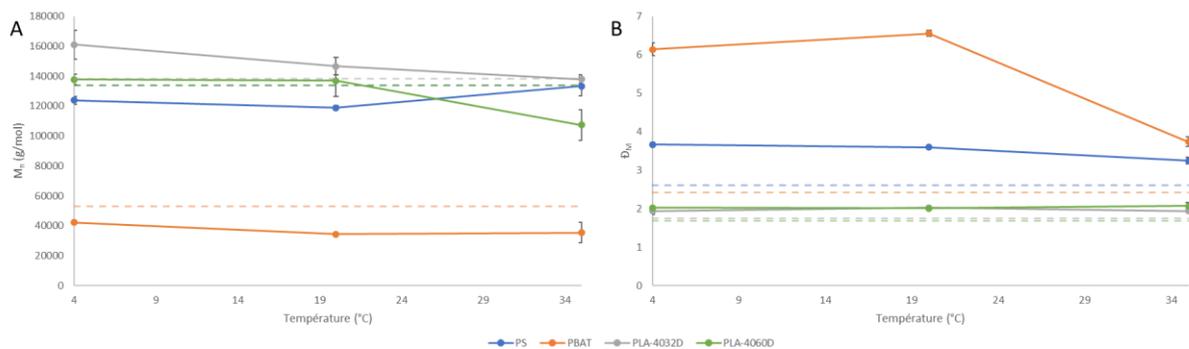


Figure 25. Evolution de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de la dispersité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et PLA-4060D après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C). Les traits pointillés correspondent à la valeur des plastiques de référence non immergé

Pour le PS, la masse molaire en nombre (M_n) est inférieure de $\pm 20\,000$ g/mol par rapport à la référence non immergée à 4°C et 20°C et ne varie pas à 35°C. Sa dispersité ne varie pas en fonction de la température, mais est supérieure à la référence de ± 1 . Le PLA-4032D a une M_n proche de la référence à toute température exceptée à 4°C où elle est supérieure de 22847 g/mol. La dispersité reste également constante en fonction de la température et est plus haute de la référence d'environ 0,2. À l'inverse, le PLA-4060D a sa M_n similaire à la référence à 4°C et 20°C et celle-ci diminue de 26408 g/mol à 35°C. Et tout comme le PLA-4032D, la dispersité ne varie pas en fonction de la température et est également supérieure à la référence d'environ 0,2. Pour finir, le PBAT a une M_n qui ne varie quasi pas en fonction de la température, mais est inférieure à la référence d'environ 15 000 g/mol. Sa diversité est la seule à varier en fonction de la température. Elle est supérieure d'environ 4 à 4°C et 20°C puis n'est plus supérieure que de 1,32 à 35°C.

4.1.4 DSC

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique qui va calculer la différence entre les échanges de chaleur d'un échantillon et d'une référence durant des transitions de phase. Elle permet de mettre en évidence plusieurs paramètres physicochimiques du plastique tel que la température de transition vitreuse (T_g), la température de fusion (T_m) et la cristallinité (χ_c). La T_g est la température à laquelle le plastique passe d'un état solide (vitreux) à un état visqueux. Ce paramètre représente l'impact de la température sur la partie amorphe du plastique et plus il est dégradé plus la T_g diminue, car la partie amorphe est la première à être dégradée. La T_m est la température à laquelle le plastique passe de l'état solide à l'état liquide. Cette transition représente l'effet sur la partie cristalline des plastiques et n'existe donc pas pour les plastiques amorphes. Cette température est toujours supérieure à la T_g . Le taux de cristallinité représente, dans les plastiques semi-cristallin, la proportion de phase cristalline présente dans le polymère. Ce taux va avoir tendance à augmenter avec la dégradation. En effet, la partie amorphe a des liaisons plus faibles et donc nécessite moins d'énergie pour les rompre et va donc être la première à être dégradée. Les valeurs de ces différents paramètres se retrouvent dans le Tableau 4.

Tableau 4. Paramètres DSC de la température de transition vitreuse (T_g), de la température de fusion (T_m) et du taux de cristallinité (χ_c) pour le PLA-4032D, le PLA-4060D, le PBAT et le PS sans immersion (t_i) et à 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

Polymère	Echantillons	T_g (°C)	T_m (°C)	χ_c (%) ³
PLA (4032D)	t_i	62	167	2.15
	3 mois	62	166	2.15
	5 mois	62	166.25	3
	8 mois	62	166.5	1.6
PLA (4060D)	t_i	58	/	Amorphe
	3 mois	58	/	Amorphe
	5 mois	59	/	Amorphe
	8 mois	58	/	Amorphe
PBAT	t_i	-29	120	15
	3 mois	-29	121	15
	5 mois	-29	121	15
	8 mois	-29	122	15
PS	t_i	106	/	Amorphe
	3 mois	106	/	Amorphe
	5 mois	105	/	Amorphe
	8 mois	105	/	Amorphe

$$^3\chi_c (\%) = \left[\frac{\Delta H_{m(t)} - \Delta H_{c(t)}}{\Delta H_m^0} \right] \times 100$$

Comme précédemment, tous les plastiques de l'aquarium ont été analysés par DSC. Aucun des plastiques ne montre de modification de sa T_g en huit mois d'immersion en milieu marin (Figure 26A). Le taux de cristallinité du PBAT augmente légèrement après 7 mois passant à $15.35 \pm 0.51\%$ au lieu de 15% précédemment. Le PLA-4032D a une augmentation de son taux de cristallinité après 5 mois arrivant jusqu'à $3 \pm 0.5\%$ comparé aux 2.15% de la référence. Il passe en dessous de la référence à huit mois d'immersion avec une valeur de $1.6 \pm 0.6\%$.

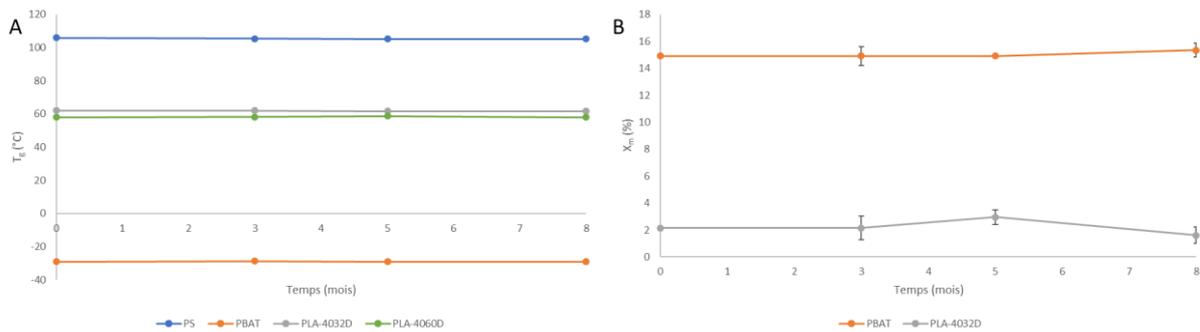


Figure 26. Evolution de la température de transition vitreuse (A) et du taux de cristallinité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D avant immersion et après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

Les plastiques de l'expérience étudiant l'impact de la température et des UV ont également été analysés. Aucune modification de la T_g n'est observable en fonction de la température et elle est la même que celle du plastique non immergé (Figure 27A).

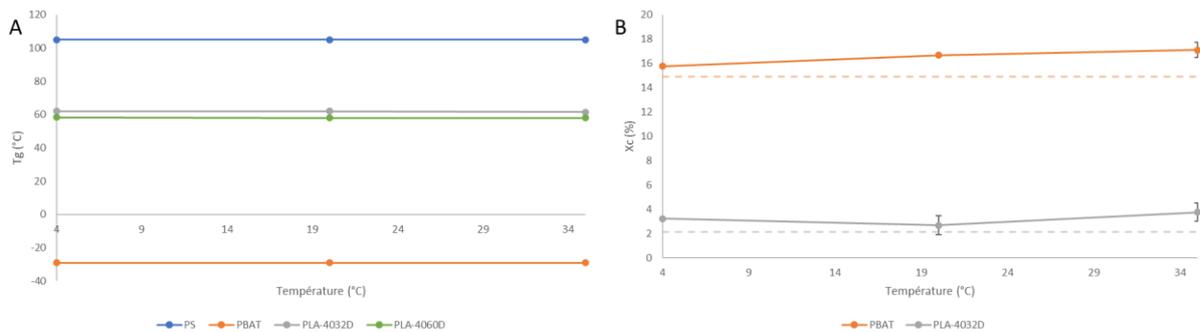


Figure 27. Evolution de la température de transition vitreuse (A) et du taux de cristallinité (B) du PS, PBAT, PLA-4032D et du PLA-4060D après deux mois d'immersion dans de l'eau de mer artificielle à différentes températures (4°C, 20°C et 35°C) et sous lampe UV. Les droites en pointillés représentent la valeur du paramètre du plastique non immergé.

Le taux de cristallinité du PBAT augmente légèrement avec la température passant de 15.8% à $17.1 \pm 0.6\%$ à 35°C (Figure 27B). Il est également supérieur au taux de cristallinité du PBAT non immergé qui est de 15%. Le taux de cristallinité du PLA-4032D reste assez stable en fonction de la température en variant entre $2.7 \pm 0.8\%$ à 20°C à $3.8 \pm 0.8\%$ à 35°C. Lui aussi se situe au-dessus du PLA-4032D non immergé (2.15%).

4.2 Analyse microbiologique

Chaque plastique a été pris en photo avant la récupération du biofilm afin de voir son évolution visuelle au cours du temps (Figure 28). En effet, la couleur, l'abondance, la répartition du biofilm sont des premiers indicateurs d'une évolution et d'une dynamique de la communauté bactérienne.

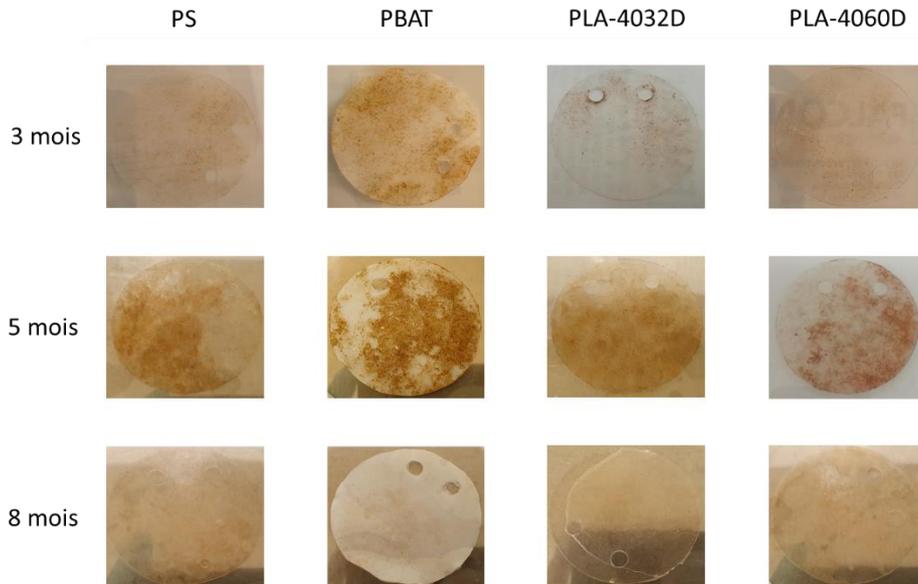


Figure 28. Photos des biofilms qui se sont développés sur les plastiques (PS, PLA-4032D, PLA-4060D et PBAT) après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

La couleur des biofilms varie légèrement avec une couleur plutôt brunâtre pour le PBAT et un aspect un peu plus rose/rouge pour les PLA et le PS. Des quatre plastiques immergés, le PBAT est celui avec le biofilm le plus abondant. Les biofilms semblent se répartir de manière homogène sur la surface de tous les plastiques.

4.2.1 DGGE

Pour avoir une idée des communautés bactériennes composant les biofilms se développant sur les plastiques, plusieurs DGGE ont été réalisées. Celles-ci ont été faites sur un fragment de 200 paires de base du gène codant pour une zone hypervariable de l'ARNr 16S et ce dernier a été amplifié par PCR. Cette technique permet de séparer des brins d'ADN de même taille, mais ayant des séquences différentes. En effet, le gel contient un gradient en dénaturant (l'urée et le formamide). Les brins d'ADN vont donc être dénaturés au fur et à mesure de leur avancée dans le gel en fonction de son pourcentage en paire de base GC. Plus l'ADN contient un haut pourcentage en GC, plus il faudra une forte concentration en dénaturant et donc l'ADN migrera

loin dans le gel. Dès que la dénaturation est complète, la migration dans le gel s'arrête. Chaque bande représente donc théoriquement une espèce de bactérie différente (Ercolini, 2004).

Quatre DGGE ont été réalisées pour analyser l'entièreté des échantillons. Les trois premiers gels correspondent chacun à un temps de prélèvement (3 mois, 5 mois et 8 mois) et comportent donc 16 échantillons (4 répliquas de chaque plastique). Le dernier gel est une comparaison aux différents temps de chaque plastique.

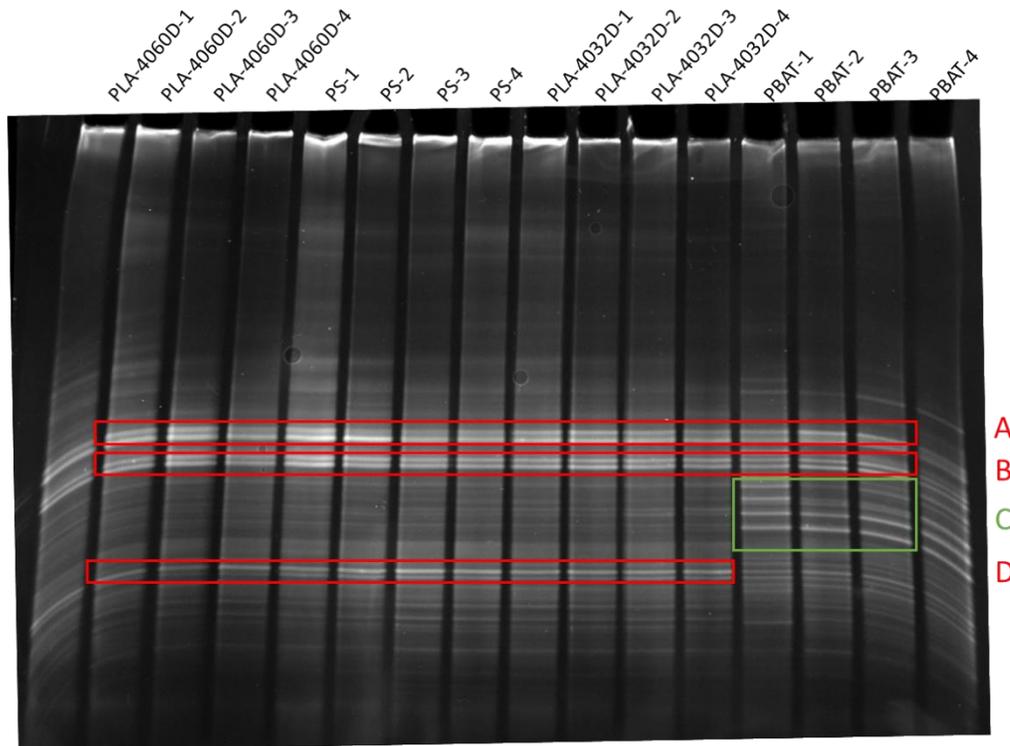


Figure 29. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après trois mois d'immersion en milieu marin. Les encadrés rouges mettent en évidence les bandes majoritaires.

Les échantillons après trois mois d'immersion montrent plusieurs bandes majoritaires (Figure 29). Les encadrés A et B mettent en évidence quatre bandes majoritaires présentes sur l'entièreté des plastiques. L'encadré D montre une bande majoritaire plus basse dans le gel qui est intense pour le PLA-4032D, PLA-4060D et le PS, mais minoritaire pour le PBAT. Ce dernier comporte des bandes majoritaires supplémentaires situées dans l'encadré C. Celles-ci sont très légèrement visibles sur le reste des plastiques, mais sont clairement identifiable uniquement sur le PBAT.

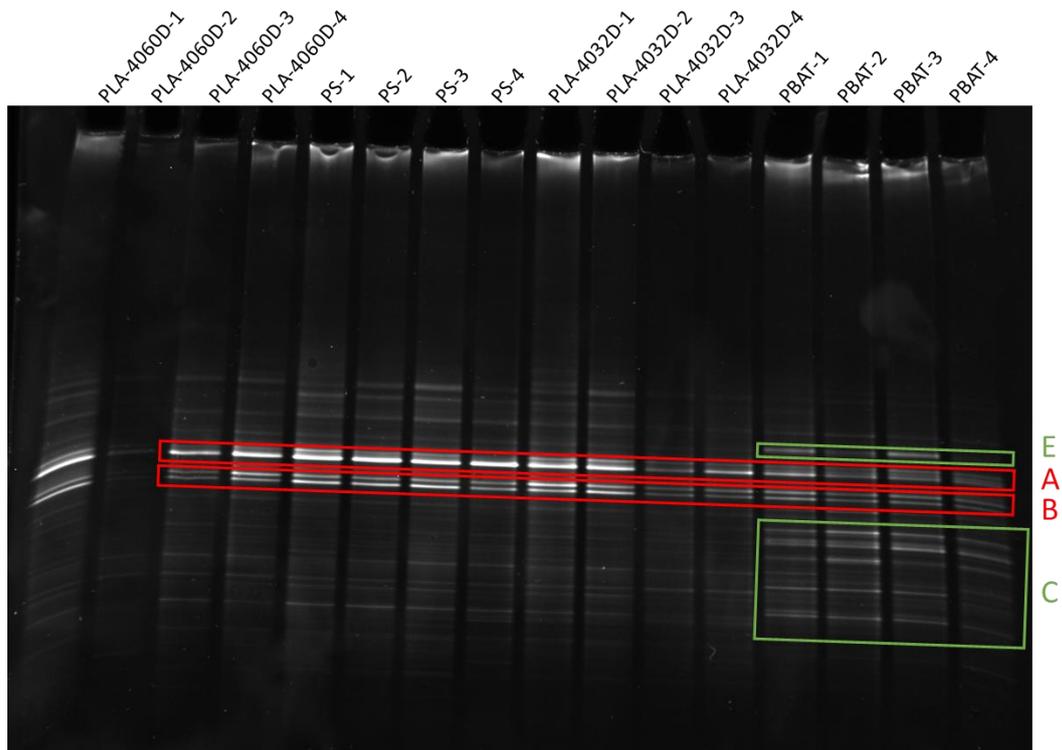


Figure 30. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après cinq mois d'immersion en milieu marin.

Concernant les communautés bactériennes après cinq mois d'immersion, plusieurs bandes majoritaires sont toujours visibles (Figure 30). Le PS, le PLA-4032D et le PLA-4060D ont toujours un profil similaire, l'encadré A met en évidence deux bandes majoritaires dont l'une des deux semble plus intense que l'autre. Deux bandes majoritaires sont visibles plus bas dans le gel au niveau de l'encadré B. Le PBAT a un profil différent avec deux bandes majoritaires dans l'encadré A et B, mais moins intense que pour le reste des plastiques. Par contre, d'autres bandes majoritaires sont visibles dans l'encadré C plus bas dans le gel ainsi qu'une bande située dans l'encadré E. L'encadré C contient cinq bandes majoritaires qui sont également visibles sur les autres plastiques, mais en minorité comparé aux encadrés A et B. Certains échantillons comme le PLA-4060D-2 sont moins visible que les autres. Ceci est certainement dû au fait que moins d'ADN était présent dans ce biofilm.

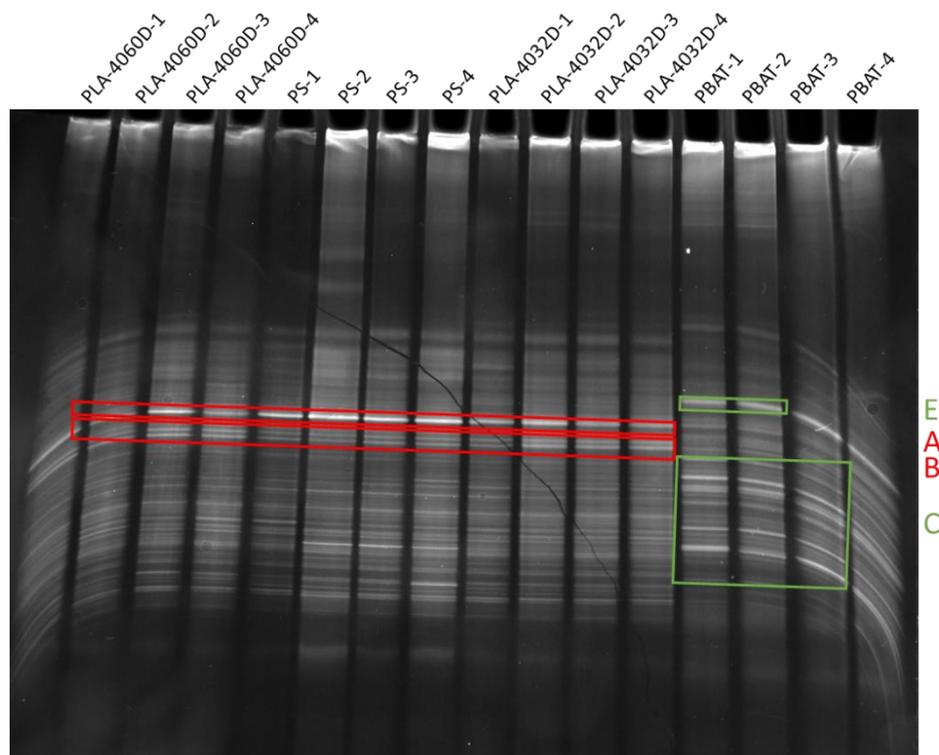


Figure 31. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après huit mois d'immersion en milieu marin.

Pour les échantillons des huit mois, les observations sont similaires aux précédentes. En effet, différentes bandes majoritaires sont visibles (Figure 31). Le PLA-4032D, le PLA-4060D et le PS ont des profils similaires avec une seule bande majoritaire mise en évidence dans l'encadré A et deux bandes majoritaires dans l'encadré B. Le PBAT n'a plus de bande majoritaire commune avec les autres plastiques, mais une plus haute mise en évidence par l'encadré E. L'encadré C met en évidence cinq bandes majoritaires du PBAT qui sont également présentes pour les autres plastiques, mais de manière minoritaire.

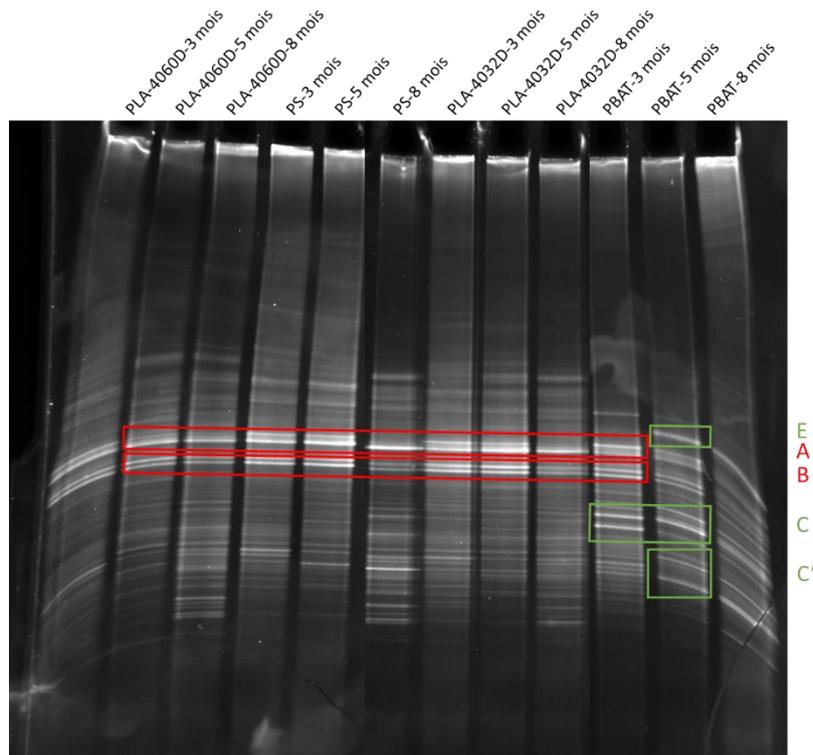


Figure 32. Gel DGGE du gène codant pour l'ARNr 16S des communautés bactériennes présentes en biofilms sur quatre types de plastiques (PLA-4060D, PS, PLA-4032D, PBAT) après trois, cinq et huit mois d'immersion en milieu marin.

L'ADN de chaque plastique aux trois temps de prélèvements a été analysé sur un même gel (Figure 32). Le PLA-4032D, le PLA-4060D et le PS ont la même évolution avec tout d'abord deux bandes majoritaires au niveau de l'encadré A aux trois mois d'immersion puis, la deuxième bande devient plus intense que la première aux cinq mois pour finir par ne plus avoir qu'une bande majoritaire aux huit mois d'immersion. Les deux bandes majoritaires mises en évidence dans l'encadré B restent présentes durant les huit mois. Le PBAT a tout d'abord les quatre bandes majoritaires des encadrés A et B à trois et cinq mois d'immersion puis elles deviennent minoritaires à huit mois. On observe une apparition d'une bande dans l'encadré E à partir de cinq mois d'immersion. L'encadré C met tout d'abord en évidence deux bandes majoritaires à trois mois. Seule la bande du haut va rester majoritaire et une nouvelle bande plus haute va apparaître pour les cinq et huit mois. L'encadré C' montre l'apparition de deux bandes majoritaires plus basses à partir de cinq mois d'immersion.

5. Discussion

5.1 Analyses chimiques

5.1.1 Expérience à l'aquarium

Les analyses chimiques mettent en évidence plusieurs résultats intéressants. (i) La dégradation du PBAT est plus importante que le reste des plastiques. En effet, la perte de poids, qui traduit la dégradation du plastique par perte de matière, est de 3% pour le PBAT à la fin du temps d'expérimentation alors que les PLA, également biodégradables, n'atteignent que les 0.15% et le PS non biodégradable reste à 0% (Figure 19). Ceci confirme les observations d'études précédentes concernant la dégradation du PBAT selon lesquelles sa vitesse de dégradation en milieu marin est ralentie en n'atteignant qu'environ 2% de perte de poids en un an (Wang *et al.*, 2019). En effet, ce dernier est biodégradable en composteur industriel (température de 60°C avec dégradation en 6 mois), mais aussi en composteur domestique (température de 30°C avec dégradation en 12 mois) et en sol (température de 25°C avec dégradation en 2 ans) (Wang *et al.*, 2015; Nikolić *et al.*, 2017). La température durant notre expérience est en moyenne de 17°C ce qui est inférieur aux conditions de ces normes de dégradation. Une perte en poids de 3% au bout de 8 mois est donc cohérente.

Cette observation est confirmée par les analyses ATR-FTIR mettant en évidence l'apparition d'un pic à 1600 cm^{-1} et l'un à 3600 cm^{-1} pour le PBAT (Figure 22). Le pic à 1600 cm^{-1} correspond à l'élongation d'une liaison C=O tandis que celui à 3500 cm^{-1} correspond à l'élongation des liaisons O-H. L'apparition de ces fonctions peut signifier plusieurs choses. Elles peuvent correspondre à un phénomène d'hydrolyse durant lequel le PBAT est clivé au niveau de ses fonctions esters pour donner des fonctions acides carboxyliques et des alcools (Figure 11). Ces fonctions correspondent bien à l'apparition des pics en ATR-FTIR. Il est également possible que cette dégradation soit due à une activité biologique et à la dégradation par des microorganismes. Il est également possible que la combinaison d'une dégradation abiotique et biotique soit à l'origine de ces résultats. Le potentiel rôle de bactéries dans la dégradation du PBAT est discuté dans la section 5.2.1. La perte de poids et l'ATR-FTIR mettent donc en évidence une faible dégradation du PBAT.

Les résultats de DSC et de GPC sont plus divergents. Aucun changement n'est visible concernant la T_g et la cristallinité (Figure 26) pour le PBAT. L'augmentation de la dispersité de 0.2 est minime, mais représente potentiellement un début de dégradation. En effet, l'augmentation de la dispersité signifie que le polymère contient plus de chaînes de tailles

différentes. Lors de la dégradation, de longues chaînes de polymère sont clivées pour donner plusieurs chaînes plus courtes et la dispersité est donc augmentée. La masse molaire en nombre est censée diminuer avec la dégradation, car le nombre de chaînes augmente. Dans notre cas la masse molaire augmente très légèrement. Ceci n'est normalement pas possible, mais pourrait être expliqué par le vieillissement de la colonne de la GPC sur les huit mois de durée de l'expérience.

La GPC est une technique basée sur la longueur des chaînes du polymère tandis que la DSC est sensible à des changements conséquents dans la chimie du polymère capable d'impacter ses propriétés physicochimiques. Vu nos résultats, il semblerait que la dégradation du PBAT n'ait pas affecté ces différents paramètres. Ceci peut venir du fait que la dégradation du plastique commence à l'interface plastique/eau et donc, au début, seules les « chaînes de surface » vont être dégradées. Le reste des chaînes dans le polymère restent donc inchangées ce qui modifie très peu les paramètres de GPC et qui n'induit pas un changement radical du plastique pouvant être détectable en DSC. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les résultats d'ATR-FTIR qui elle est une technique mettant en avant la composition de surface du plastique. Le PBAT semble donc avoir été légèrement dégradé en surface, mais très peu dans sa globalité.

(ii) Les analyses ne révèlent pas de dégradation du PLA et du PS. En effet, la perte de poids des PLA reste quasi nulle ($\pm 0.15\%$ après 8 mois d'immersion) et aucune différence n'est notable sur les spectres ATR-FTIR (Figure 22). Il n'y a également aucun changement au niveau visuel, or en se dégradant le PLA devient opaque et blanchâtre. Le PLA qui est biodégradable ne montre pas plus de signes de dégradation que le PS qui est notre référence. Ceci est plutôt attendu étant donné que les conditions de dégradation du PLA sont le compostage industriel (température de 60°C) ou la digestion anaérobie (température de 50°C) (Narancic *et al.*, 2018). Notre expérience étant menée à une température moyenne de 17°C , il semble donc normal que la dégradation soit plus lente. Il a d'ailleurs été démontré que le PLA commence à être hydrolysé en milieu aqueux à 37°C à partir de trois mois (Benali *et al.*, 2015). Ceci met en évidence le rôle de la température sur la dégradation du PLA ce qui est dû à sa T_g élevée. En effet, le PLA ainsi que le PS ont des T_g bien plus élevées que le PBAT ce qui ralentit fortement leur dégradation à de basses températures.

Les résultats de DSC et de GPC vont également dans ce sens. La T_g ne varie pas au cours du temps pour les PLA et le PS (Figure 26A). Le taux de cristallinité du PLA-4032D augmente légèrement à cinq mois d'immersion de $3\pm 0.5\%$ comparé aux 2.15% du plastique non immergé

ce qui pourrait également représenter une dégradation (Figure 26B). Cette augmentation n'est plus visible après huit mois ce qui semblerait remettre en question le début de la dégradation. Il semblerait que ceci soit plutôt une variation naturelle que le début de la dégradation du PLA. Pour le paramètre de dispersité, aucune variation n'est visible au cours du temps pour les PLA et ne reste très faible pour le PS (augmentation de 0.2) (Figure 24B). La masse molaire en nombre augmente comme pour le PBAT. Comme expliqué précédemment l'explication la plus plausible semblerait être un vieillissement naturel de la colonne utilisée.

En conclusion, aux vues des résultats des différentes analyses chimiques il semblerait que les PLA et le PS n'aient subi aucune dégradation au cours des huit mois d'immersion en milieu marin. Au contraire, le PBAT a subi une faible dégradation. Ces résultats mettent en évidence la problématique des plastiques biodégradables et confirment les différentes études mettant en évidence leur dégradation plus lente en milieu marin (Harrison *et al.*, 2018; Haider *et al.*, 2019). En effet, ceux-ci ne sont en réalité dégradés que dans des conditions de températures et de concentration en microorganisme élevées. Comparé à des conditions de compostage, le milieu marin ne semble pas propice à la dégradation des plastiques. Le PLA, qui est biodégradable, ne montre pas plus de dégradation que le PS et le PBAT, même s'il présente une meilleure dégradation, n'atteint que les 3% en perte de poids après 8 mois d'immersion. Ces plastiques posent donc les mêmes problèmes que des plastiques dits « classiques », car ils restent également pendant plusieurs années dans l'environnement marin avant d'être dégradé. Il semble donc important de définir de nouvelles normes pour appeler un plastique comme biodégradable en milieu marin avec des normes adaptées. Ces plastiques restent néanmoins compostables et ont une dégradation rapide dans les bonnes conditions (Wang *et al.*, 2015; Narancic *et al.*, 2018; Haider *et al.*, 2019). Il est donc important d'améliorer la gestion de la fin de vie de ces plastiques (recyclage, compostage...) pour rendre leur côté biodégradable réellement intéressant.

5.1.2 Expérience en laboratoire

Les expériences menées à différentes températures et avec présence d'UV ou non permettent de conclure plusieurs choses. Premièrement, la température joue un rôle important dans la vitesse de dégradation et semble être corrélée positivement à celle-ci. En effet, l'observation visuelle des plastiques montre une opacité des PLA ainsi que du PS à 35°C traduisant un début de dégradation (Figure 18). En observant les pertes de poids en fonction de la température (Figure 20), on constate que la perte de poids du PBAT augmente avec la température. Pour les autres plastiques elle reste quasiment nulle démontrant encore une fois leur plus faible potentielle à la dégradation. Le PLA-4032D montre néanmoins une perte de poids plus

importante à 4°C. ceci est dû au fait que le plastique est devenu plus cassant et que des morceaux de plastiques se sont détachés de certains répliques. Il est donc intéressant de constater que pour certains plastiques, une température froide les rendant cassants couplé à une action mécanique pourrait éventuellement les fractionner en plus petits plastiques. Cette dégradation plus importante peut être notamment due à la T_g plus basse du PBAT qui va donc être plus sensible à des changements de température. Des études ont montré un début de dégradation du PLA après 3 mois à 37°C dans une solution aqueuse (Benali *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant de prolonger ces expériences sur du plus long terme pour pouvoir suivre l'évolution de la dégradation.

L'ATR-FTIR montre l'apparition de différents pics (Figure 23). Tout d'abord, l'apparition d'un pic à 2300 cm^{-1} sur les spectres à 35°C des PLA et du PS. Celui-ci peut correspondre à l'apparition d'une fonction acide carboxylique qui est le résultat d'une photo-oxydation (Bocchini *et al.*, 2010). Le PBAT quant à lui a une apparition de pics à 3500 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} à 20°C correspondant à des liaisons O-H et C=O respectivement (Figure 23). Ceci met en évidence l'hydrolyse du plastique, mais ces pics n'apparaissent plus à 35°C. Il est donc possible que ce spectre soit un artefact et ne présente en réalité aucune dégradation. Une légère dégradation en surface des plastiques est donc visible et semble n'avoir lieu qu'à 35°C.

Les paramètres de la GPC et de la DSC sont peu impactés par la température. En effet, la T_g reste inchangée pour tous les plastiques en fonction de la température (Figure 27A). Le taux de cristallinité semble être plus impacté par la température avec une augmentation de 15.8% à 4°C à $17.1\pm 0.6\%$ à 35°C pour le PBAT. Même chose pour le PLA-4032D avec une augmentation de 3.2% à 4°C à $3.8\pm 0.8\%$ à 35°C. Ces augmentations mettent donc en avant une dégradation de la chimie générale du plastique et plus particulièrement une dégradation de la partie amorphe de ceux-ci. La M_n ne varie pas en fonction de la température. La dispersité reste également la même excepté pour le PBAT où elle est plus faible à 35°C. La longueur des chaînes des plastiques ne semble donc pas impactée par des conditions de température différentes.

Les résultats mettent donc en évidence un rôle du paramètre de température sur la dégradation. Une plus haute température semble en effet accélérer le processus de dégradation. Le PBAT est le plastique qui semble le plus sensible à ce paramètre sur une durée de deux mois. La perte de poids et les spectres ATR-FTIR semblent les plus impactés et donc confirme l'hypothèse que la dégradation commence à la surface du plastique et pas sur l'entièreté de celui-ci.

La deuxième conclusion de ces résultats concerne l'impact des UVs. La perte de poids est plus importante en présence d'UVs pour le PBAT. Pour les autres plastiques, elle n'est pas significativement différente avec ou sans exposition aux UVs et est même des fois plus faible (Figure 21). On peut donc en déduire que le PBAT semble plus sensible à l'exposition UVs que les autres plastiques. La masse molaire en nombre (Figure 25A) est plus basse pour tous les plastiques en comparaison aux plastiques non immergés. La dispersité est, quant à elle, plus élevée pour tous les plastiques comparés à celui non immergé (Figure 25B). Ces deux paramètres mettent donc en évidence la scission de longues chaînes de polymère pour en créer de plus petites et donc une dégradation par hydrolyse. Pour la DSC, aucune variation de la Tg n'est visible comparé aux références. Cependant le taux de cristallinité du PBAT et du PLA-4032D sont tous deux supérieurs ce qui met en évidence une dégradation de la partie amorphe des plastiques. Les UVs ont donc un rôle dans la dégradation au niveau de la surface, mais aussi au niveau de la scission des chaînes du polymère et de sa chimie en général. Ceci est cohérent avec la littérature qui montre un rôle important des radiations UVs. En effet, il a été montré qu'une exposition aux UV peut faire passer de 20% à 40% la dégradation du PLA et du PBAT dans des conditions de compostage sur une durée de 90 jours (Stloukal *et al.*, 2012).

En conclusion, les paramètres de température ainsi que de radiations UVs jouent un rôle important dans la dégradation des plastiques. Plus la température est haute et l'exposition aux UVs est importante plus les plastiques vont se dégrader rapidement. Ces résultats mettent donc en avant l'importance de l'endroit des plastiques dans la colonne d'eau. En effet, un plastique flottant à la surface va donc être exposé à des températures et des radiations UVs plus élevées qu'un plastique se trouvant sur les sédiments. Sa dégradation abiotique sera donc plus rapide quand il sera plus haut dans la colonne d'eau.

5.2 Analyse microbiologique

5.2.1 DGGE

Concernant les échantillons après trois mois d'immersion nous constatons quatre bandes majoritaires, comprises dans les encadrés A et B, présentent sur tous les plastiques (Figure 29). Il semblerait donc que certaines espèces de bactéries colonisent l'ensemble des plastiques sans distinction particulière entre ceux-ci. Une autre bande intense (bande D) se trouve sur tous les plastiques, mais est beaucoup moins intense sur le PBAT. Les mêmes bactéries sont donc présentes sur tous les plastiques, mais certaines se sont moins développées. Ceci permet

d'émettre l'hypothèse que ces bactéries utilisent le plastique comme un support pour se développer en biofilm et non pas comme source de carbone. En effet, des études mettent en évidence que peu d'espèces sont spécifiques à un type de plastique et vont simplement l'utiliser comme support de croissance en utilisant d'autres sources de carbone plus facilement accessibles dans le milieu marin (Pinto *et al.*, 2019). Les résultats chimiques effectués sur le plastique confirment cette hypothèse, car aucune dégradation des PLA et du PS n'a été constatée (voir section 5.1.1).

De plus, on peut clairement observer des bandes plus intenses sur le PBAT qui ne sont pas ou très peu présentes sur les autres plastiques (Figure 29). Une communauté bactérienne propre au PBAT s'est donc développée. Les résultats chimiques mettent clairement en avant une dégradation plus importante du PBAT (voir section 5.1.1). Il est donc possible que cette sélection de bactéries soit due au fait qu'elles seraient capables d'utiliser le plastique comme source de carbone et donc de le dégrader. De plus, les plastiques ont été placés de manière aléatoire sur le cadre dans l'aquarium et les quatre répliques du PBAT présentent ces caractéristiques, ce qui prouve que ce résultat est reproductible.

Les échantillons des cinq mois et des huit mois d'immersion présentent plusieurs bandes majoritaires (Figure 30 et Figure 31). Le PLA-4032D, le PLA-4060D et PS sont de nouveaux similaires avec des bandes majoritaires au niveau de l'encadré A et B. Ces résultats confirment l'hypothèse que les bactéries n'utilisent ces plastiques que comme support et vont certainement chercher leur source de carbone dans la colonne d'eau. La composition du biofilm se développant sur le PBAT montre toujours une sélection de bactéries mises en évidence par les encadrés C et E. Ceci confirme les résultats chimiques obtenus ainsi que l'hypothèse émise plus haut selon laquelle les bactéries vont dégrader le plastique pour l'utiliser comme source de carbone.

En conclusion, les communautés bactériennes des PLA et du PS sont similaires et utilisent ces derniers comme support. Ceci est en adéquation avec la littérature qui démontre que les bactéries se développent sur un plastique afin de les utiliser comme support de croissance en fonction de leurs propriétés de surface (principalement la rugosité, l'hydrophobicité...) plutôt que pour son apport en carbone (Cunliffe *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2017). En effet, d'autres sources de carbone beaucoup plus accessibles dans le milieu marin seront favorisées. La dégradation de ces plastiques aura donc comme origine l'activité hydrolytique de l'eau. La

dégradation est dès lors plus lente comme le prouvent les résultats d'analyses chimiques des plastiques.

Au contraire, concernant le PBAT, certaines bactéries spécifiques à ce polymère ont été sélectionnées au cours du temps. Il est également le seul des plastiques analysés qui présente une perte de poids (environ 3%) après huit mois d'immersion. Comme vu dans la section 5.1.1, une légère dégradation est observable pour le PBAT. Deux hypothèses sont donc possibles : (i) le PBAT est plus facilement dégradé par hydrolyse et donc disponible comme source de carbone par les bactéries et celles-ci choisissent donc d'y développer un biofilm ; (ii) les bactéries sélectionnent le PBAT, car leur activité enzymatique leur permet de le dégrader et de l'assimiler, phénomène qui va être accumulé à celui d'hydrolyse. La deuxième hypothèse semble la plus probable, car les bactéries spécifiques au PBAT sont visibles à partir des trois mois d'immersion tandis que les signes de dégradation par hydrolyse (ATR-FTIR) ne sont visibles qu'à partir de huit mois. Le PBAT est donc dégradé de manière abiotique et biotique. Des études ont déjà mis en évidence des bactéries thermophiles capables de dégrader le PBAT à une température de 55°C en 21 jours (Witt *et al.*, 2001). Une étude similaire réalisée démontre que la dégradation de ces bactéries est fortement limitée par la température et n'atteint plus que 2% de perte de poids en 21 jours à 30°C (Trinh Tan *et al.*, 2008). Il faudrait donc poursuivre les recherches et identifier les espèces spécifiques au biofilm du PBAT et réaliser des expériences pour prouver leur rôle dans la dégradation de ce dernier.

Pour la DGGE de comparaison à différent temps (Figure 32) une dynamique de la composition des communautés bactériennes au cours du temps est clairement observable ; des espèces vont se développer tandis que d'autres vont disparaître. En effet, le PS, le PLA-4032D et le PLA-4060D ont tout d'abord quatre bandes majoritaires communes. Après huit mois d'immersion, les communautés bactériennes ont évolué et seul une bande est encore majoritaire dans l'encadré A. Les deux bandes majoritaires de l'encadré B restent présentes, mais leur intensité diminue avec le temps. Le biofilm du PBAT évolue également avec des bandes majoritaires qui apparaissent et disparaissent après cinq et huit mois d'immersion. Ces résultats correspondent à une dynamique des biofilms. En effet, il a été montré que les plastiques immergés dans un milieu marin ont des colonisateurs primaires tels que les *Gamma* et les *Alphaproteobacteria* qui vont former les plus abondants au début de la formation du biofilm sur le plastique. Elles vont ensuite être remplacées progressivement par des *Bacteroidetes* qui sont des colonisateurs secondaires et qui vont être les plus abondants dans les biofilms (Elifantz *et al.*, 2013). Il est donc normal d'avoir des bandes qui deviennent majoritaires et d'autres qui disparaissent.

6. Conclusion et perspectives

Les plastiques sont une menace pour l'environnement et plus particulièrement l'environnement marin. Ils peuvent être une menace directe par étranglement, enchevêtrement, ingestion... mais également un vecteur de transport de polluants et de maladies. Les plastiques biodégradables sont donc vus comme une solution à ce problème, car ils sont plus facilement dégradables. Mais cette dégradation en milieu marin est mal connue.

Cette étude avait pour but de suivre la dégradation de plastiques biodégradables et la communauté bactérienne se développant dessus en milieu marin ainsi que l'impact de paramètres abiotiques sur la dégradation de ceux-ci. Les résultats obtenus montrent une dégradation faible voire nulle de ces plastiques après huit mois d'immersion. L'augmentation de la température et des rayonnements UVs ont montrés un rôle dans l'accélération de la dégradation des plastiques biodégradables. Une sélectivité dans la communauté bactérienne se développant sur le PBAT a également été constatée. Celle-ci serait potentiellement capable de le dégrader. Les autres plastiques, quant à eux, semblent servir uniquement de support pour le développement des biofilms.

Cette étude a donc mis en évidence le problème de dégradation des plastiques biodégradables en milieu marin et le besoin d'avoir une gestion de ces déchets en amont. Elle permet également de constater que l'emplacement des plastiques dans la colonne d'eau va jouer un rôle conséquent sur sa dégradation. Et enfin, elle souligne le support que représentent les plastiques pour le développement de biofilms et le rôle que ce dernier peut jouer dans la dégradation.

Afin d'aller plus loin dans cette étude, l'ADN récupéré sur les biofilms de chaque plastique va être séquencé pour pouvoir déterminer avec précision la composition des communautés bactériennes. Les expériences de température et d'exposition aux UV vont également être prolongées pour avoir une analyse de l'évolution temporelle de ces paramètres.

Les résultats de ce mémoire permettent de lancer plusieurs pistes d'études. Notamment concernant l'étude de la communauté bactérienne du PBAT et de son potentiel rôle dans la dégradation de celui-ci. Il serait également intéressant de continuer les tests de dégradabilité sur du plus long terme et avec différents paramètres abiotiques afin de déterminer leur rôle au cours du temps sur la dégradation des plastiques biodégradables.

7. Bibliographie

- Al-Itry, R. *et al* (2012) 'Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy', *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier Ltd, 97(10), pp. 1898–1914. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.06.028.
- Andrady, A. L. (2015) 'Persistence of Plastic Litter in the Oceans', in *Marine Anthropogenic Litter*. Cham: Springer International Publishing, pp. 57–72. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_3.
- Andrady, A. L. & Neal, M. A. (2009) 'Applications and societal benefits of plastics', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), pp. 1977–1984. doi: 10.1098/rstb.2008.0304.
- Artham, T. & Doble, M. (2008) 'Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates', *Macromolecular Bioscience*, 8(1), pp. 14–24. doi: 10.1002/mabi.200700106.
- Arthur, C. *et al* (2009) 'Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris', *Group*, (January), p. 530.
- Barlow, D. E. *et al*. (2020) 'Edge-Localized Biodeterioration and Secondary Microplastic Formation by *Papiliotrema laurentii* Unsaturated Biofilm Cells on Polyurethane Films', *Langmuir*, 36(6), pp. 1596–1607. doi: 10.1021/acs.langmuir.9b03421.
- Barnes, D. K. A. *et al*. (2009) 'Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), pp. 1985–1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205.
- Bastarrachea, L. *et al*. (2010) 'Biodegradable Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*', *Journal of Food Science*, 75(4), pp. E215–E224. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x.
- Baulch, S. & Perry, C. (2014) 'Evaluating the impacts of marine debris on cetaceans', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 80(1–2), pp. 210–221. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.050.
- Baum, B. (1974) 'The weathering degradation of polyolefins', *Polymer Engineering and Science*, 14(3), pp. 206–211. doi: 10.1002/pen.760140309.
- Benali, S. *et al*. (2015) 'Key factors for tuning hydrolytic degradation of polylactide/zinc oxide nanocomposites', *Nanocomposites*, 1(1), pp. 51–61. doi: 10.1179/2055033214Y.0000000007.
- Bocchini, S. *et al*. (2010) 'Polylactic Acid and Polylactic Acid-Based Nanocomposite Photooxidation', *Biomacromolecules*, 11(11), pp. 2919–2926. doi: 10.1021/bm1006773.
- Bott, T. R. & Pinheiro, M. M. V. P. S. (1977) 'Biological fouling - velocity and temperature effects', *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 55(4), pp. 473–474. doi: 10.1002/cjce.5450550420.
- Browne, M. A. *et al*. (2008) 'Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.)', *Environmental Science & Technology*, 42(13), pp. 5026–5031. doi: 10.1021/es800249a.
- Carpenter, E. J. & Smith, K. L. (1972) 'Plastics on the Sargasso Sea Surface', *Science*, 175(4027), pp. 1240–1241. doi: 10.1126/science.175.4027.1240.
- Chae, Y. *et al*. (2018) 'Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), p. 284. doi: 10.1038/s41598-017-18849-y.
- Cole, M. *et al*. (2011) 'Microplastics as contaminants in the marine environment: A review', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 62(12), pp. 2588–2597. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Cunliffe, D. *et al*. (1999) 'Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces', *Applied and Environmental*

Microbiology, 65(11), pp. 4995–5002. doi: 10.1128/AEM.65.11.4995-5002.1999.

Dammak, M. *et al.* (2020) ‘Blends of PBAT with plasticized starch for packaging applications: Mechanical properties, rheological behaviour and biodegradability’, *Industrial Crops and Products*, 144(May 2019), p. 112061. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112061.

Deel, O. (1995) *Plastic Media Blasting*.

Desforges, J.-P. *et al.* (2015) ‘Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean’, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer US, 69(3), pp. 320–330. doi: 10.1007/s00244-015-0172-5.

Donlan, R. M. (2002) ‘Biofilms: Microbial Life on Surfaces’, *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063.

Elifantz, H. *et al.* (2013) ‘Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater’, *FEMS Microbiology Ecology*, 85(2), pp. 348–357. doi: 10.1111/1574-6941.12122.

Ercolini, D. (2004) ‘PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food’, *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp. 297–314. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.006.

European Bioplastics (2004) *Bioplastics: Facts and figures, BIOPLASTICS – definition, materials and technology*. Available at: <https://www.european-bioplastics.org/>.

Feldkamp, S. D. *et al.* (1989) ‘Energetic and behavioral effects of net entanglement on juvenile northern fur seals, *Callorhinus ursinus*’, *Fishery Bulletin*, 87(1), pp. 85–94.

Gao, J., Hungenberg, K. D. & Penlidis, A. (2004) ‘Process modelling and optimization of styrene polymerization’, *Macromolecular Symposia*, 206(1), pp. 509–522. doi: 10.1002/masy.200450239.

GESAMP (2015) ‘Sources, fate and effects of MP in the marine environment : A Global Assessment’, *Journal Series GESAMP Reports and Studies*, 90, p. 98. Available at: www.imo.org.

Geyer, R., Jambeck, J. R. and Law, K. L. (2017) ‘Production , use , and fate of all plastics ever made’, *Science advances*, 3(July), pp. 25–29. doi: 10.1126/sciadv.170078.

Gillan, D. C. *et al.* (2005) ‘Structure of Sediment-Associated Microbial Communities along a Heavy-Metal Contamination Gradient in the Marine Environment’, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), pp. 679–690. doi: 10.1128/AEM.71.2.679-690.2005.

Good, T. P. *et al.* (2010) ‘Derelict fishing nets in Puget Sound and the Northwest Straits: Patterns and threats to marine fauna’, *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 60(1), pp. 39–50. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.09.005.

Grigat, E. (1978) ‘Hydrolyse des déchets de matières plastiques’, *Matériaux & Techniques*, 66(4), pp. 141–145. doi: 10.1051/mattech/197866040141.

Gu, J.-D. (2003) ‘Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances’, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), pp. 69–91. doi: 10.1016/S0964-8305(02)00177-4.

Haider, T. P. *et al.* (2019) ‘Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society’, *Angewandte Chemie International Edition*, 58(1), pp. 50–62. doi: 10.1002/anie.201805766.

Hamad, K. *et al.* (2018) ‘Polylactic acid blends: The future of green, light and tough’, *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd, 85, pp. 83–127. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2018.07.001.

Harrison, J. P. *et al.* (2018) ‘Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review’, *Royal Society Open Science*, 5(5), p. 171792. doi:

10.1098/rsos.171792.

Herrera, R. *et al.* (2002) ‘Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate- co - terephthalate)s’, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 40(23), pp. 4141–4157. doi: 10.1002/pola.10501.

Holmes, L. A. *et al.* (2012) ‘Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment’, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 160(1), pp. 42–48. doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.052.

Huang, Y. Q. *et al.* (2012) ‘Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts’, *Environment International*. Elsevier Ltd, 42(1), pp. 91–99. doi: 10.1016/j.envint.2011.04.010.

Jambeck, J. R. *et al.* (2015) ‘Plastic waste inputs from land into the ocean’, *Science*, 347(6223), pp. 768–771. doi: 10.1126/science.1260352.

Jarerat, A. *et al.* (2002) ‘Poly(L-lactide)-Degrading Activity in Various Actinomycetes’, *Macromolecular Bioscience*, 2(9), pp. 420–428. doi: 10.1002/mabi.200290001.

Jones, M. M. (1995) ‘Fishing debris in the Australian marine environment’, *Marine Pollution Bulletin*, 30(1), pp. 25–33. doi: 10.1016/0025-326X(94)00108-L.

Kridler & Kenyon (1969) ‘Laysan Albatrosses swallow ingestible matter’, *Auk*, 86, pp. 339–343.

Lenz, R. W. (1993) ‘Biodegradable polymers’, in *Biopolymers I*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1–40. doi: 10.1007/BFb0027550.

Li, W. C. *et al.* (2016) ‘Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects’, *Science of The Total Environment*, 566–567, pp. 333–349. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.084.

Luo, Y. *et al.* (2019) ‘Biodegradation Assessment of Poly (Lactic Acid) Filled with Functionalized Titania Nanoparticles (PLA/TiO₂) under Compost Conditions’, *Nanoscale Research Letters*. Nanoscale Research Letters, 14(1), p. 56. doi: 10.1186/s11671-019-2891-4.

Ma, J. *et al.* (2019) ‘Effect of microplastic size on the adsorption behavior and mechanism of triclosan on polyvinyl chloride’, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 254, p. 113104. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113104.

Mahajan, N. & Gupta, P. (2015) ‘New insights into the microbial degradation of polyurethanes’, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5(52), pp. 41839–41854. doi: 10.1039/C5RA04589D.

Marshall, K. C. (1985) ‘Mechanisms of Bacterial Adhesion at Solid-Water Interfaces’, in *Bacterial Adhesion*. Boston, MA: Springer US, pp. 133–161. doi: 10.1007/978-1-4615-6514-7_6.

Maul, J. *et al.* (2007) ‘Polystyrene and Styrene Copolymers’, in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 6.5-621. doi: 10.1002/14356007.a21_615.pub2.

Mehta, R. *et al.* (2005) ‘Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review’, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 45(4), pp. 325–349. doi: 10.1080/15321790500304148.

Melo, L. F. & Bott, T. R. (1997) ‘Biofouling in water systems’, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4), pp. 375–381. doi: 10.1016/S0894-1777(96)00139-2.

Mercier, A. *et al.* (2017) ‘Fate of Eight Different Polymers under Uncontrolled Composting Conditions: Relationships Between Deterioration, Biofilm Formation, and the Material Surface Properties’, *Environmental Science & Technology*, 51(4), pp. 1988–1997. doi: 10.1021/acs.est.6b03530.

Narancic, T. *et al.* (2018) ‘Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life

- Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution', *Environmental Science & Technology*, 52(18), pp. 10441–10452. doi: 10.1021/acs.est.8b02963.
- Nikolić, M. A. L. *et al.* (2017) 'The challenges in lifetime prediction of oxodegradable polyolefin and biodegradable polymer films', *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier Ltd, 145, pp. 102–119. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.07.018.
- OSPAR Commission (2000) 'Chemistry', in *Quality Status Report 2000*, pp. 41–64. Available at: https://qsr2010.ospar.org/media/assessments/QSR_2000.pdf.
- Patel, M. M. *et al.* (2009) 'Getting into the Brain', *CNS Drugs*, 23(1), pp. 35–58. doi: 10.2165/0023210-200923010-00003.
- Pemberton, D. *et al.* (1992) 'Entanglement of Australian fur seals in man-made debris in Tasmanian waters', *Wildlife Research*, 19(2), p. 151. doi: 10.1071/WR9920151.
- Pinto, M. *et al.* (2019) 'The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession', *PLOS ONE*. Edited by J. J. Kelly, 14(6), p. e0217165. doi: 10.1371/journal.pone.0217165.
- PlasticsEurope (2018) *Plastics – the Facts 2018, An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Available at: www.plasticseurope.org.
- Pompilio, A. *et al.* (2008) 'Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility', *FEMS Microbiology Letters*, 287(1), pp. 41–47. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01292.x.
- Pospišil, J. *et al.* (1998) 'The origin and role of structural inhomogeneities and impurities in material recycling of plastics', *Macromolecular Symposia*, 135(1), pp. 247–263. doi: 10.1002/masy.19981350127.
- Rahman, F. *et al.* (2001) 'Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants', *Science of The Total Environment*, 275(1–3), pp. 1–17. doi: 10.1016/S0048-9697(01)00852-X.
- Ren, Y. *et al.* (2019) 'Biodegradation Behavior of Poly (Lactic Acid) (PLA), Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT), and Their Blends Under Digested Sludge Conditions', *Journal of Polymers and the Environment*. Springer US, 27(12), pp. 2784–2792. doi: 10.1007/s10924-019-01563-3.
- Revel, M. *et al.* (2018) 'Micro(nano)plastics: A threat to human health?', *Current Opinion in Environmental Science & Health*. Elsevier Ltd, 1, pp. 17–23. doi: 10.1016/j.coesh.2017.10.003.
- Rijnaarts, H. H. M. *et al.* (1993) 'Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), pp. 3255–3265. doi: 10.1128/AEM.59.10.3255-3265.1993.
- Rocca-Smith, J. R. *et al.* (2017) 'Beyond Biodegradability of Poly(lactic acid): Physical and Chemical Stability in Humid Environments', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(3), pp. 2751–2762. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b03088.
- Roy, P. K. *et al.* (2008) 'Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium', *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), pp. 1917–1922. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.016.
- Ryan, P. G. (1988) 'Effects of ingested plastic on seabird feeding: Evidence from chickens', *Marine Pollution Bulletin*, 19(3), pp. 125–128. doi: 10.1016/0025-326X(88)90708-4.
- Ryan, P. G. *et al.* (2009) 'Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), pp. 1999–2012. doi: 10.1098/rstb.2008.0207.
- Ryan, P. G. (2015) 'A Brief History of Marine Litter Research', in *Marine Anthropogenic Litter*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–25. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_1.

- Scordino, J. (1985) 'Studies on fur seal entanglement, 1981-1984, St. Paul Island, Alaska', *Proceedings of the Workshop on the Fate and Impact of Marine Debris, 27-29 November 1984, Honolulu, HI*, (February), pp. 278–290.
- Sin, L. T. & Tueen, B. S. (2019) 'Synthesis and Production of Poly(Lactic Acid)', in *Poly(lactic Acid)*. Elsevier, pp. 53–95. doi: 10.1016/B978-0-12-814472-5.00002-9.
- Singh, B. & Sharma, N. (2008) 'Mechanistic implications of plastic degradation', *Polymer Degradation and Stability*, 93(3), pp. 561–584. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.
- Song, F. *et al.* (2015) 'Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation', *Journal of Dental Research*, 94(8), pp. 1027–1034. doi: 10.1177/0022034515587690.
- Stloukal, P. *et al.* (2012) 'Assessment of the interrelation between photooxidation and biodegradation of selected polyesters after artificial weathering', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 88(10), pp. 1214–1219. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.072.
- Talsness, C. E. *et al.* (2009) 'Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), pp. 2079–2096. doi: 10.1098/rstb.2008.0281.
- Thompson, R. C. (2006) 'Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions.', *Marine Nature Conservation in Europe*, (May 2006), pp. 107–116. Available at: https://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/themen/meeresundkuestenschutz/downloads/Fachtagungen/Marine-Nature-Conservation-2006/Proceedings-Marine_Nature_Conservation_in_Europe_2006.pdf.
- Tosin, M. *et al.* (2012) 'Laboratory Test Methods to Determine the Degradation of Plastics in Marine Environmental Conditions', *Frontiers in Microbiology*, 3(JUN), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2012.00225.
- Trinh Tan, F. *et al.* (2008) 'Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms', *Polymer Degradation and Stability*, 93(8), pp. 1479–1485. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.005.
- Verran, J. & Boyd, R. D. (2001) 'The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: A review', *Biofouling*, 17(1), pp. 59–71. doi: 10.1080/08927010109378465.
- Vert, M. *et al.* (2012) 'Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)', *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), pp. 377–410. doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- Wang, H. *et al.* (2015) 'Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films', *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier Ltd, 116, pp. 14–22. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.03.007.
- Wang, X.-W. *et al.* (2019) 'Degradability comparison of poly(butylene adipate terephthalate) and its composites filled with starch and calcium carbonate in different aquatic environments', *Journal of Applied Polymer Science*, 136(2), p. 46916. doi: 10.1002/app.46916.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000) 'Biofilm, City of Microbes', *Journal of Bacteriology*, 182(10), pp. 2675–2679. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- Westerhoff, P. *et al.* (2008) 'Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water', *Water Research*, 42(3), pp. 551–556. doi: 10.1016/j.watres.2007.07.048.
- Wilkes, R. A. & Aristilde, L. (2017) 'Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges', *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), pp. 582–593. doi: 10.1111/jam.13472.
- Witt, U. *et al.* (2001) 'Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final

biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates', *Chemosphere*, 44(2), pp. 289–299. doi: 10.1016/S0045-6535(00)00162-4.

Zhang, J. *et al.* (2009) 'Synthesis of poly(L+) lactic acid) by polycondensation method in solution', *Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology*, 11(4), pp. 3–8. doi: 10.1007/978-0-387-88483-7-1.

Zhao, P. *et al.* (2010) 'Preparation, Mechanical, and Thermal Properties of Biodegradable Polyesters/Poly(Lactic Acid) Blends', *Journal of Nanomaterials*, 2010, pp. 1–8. doi: 10.1155/2010/287082.

Zheng, D. *et al.* (1994) 'Influence of laminar flow velocity and nutrient concentration on attachment of marine bacterioplankton', *Biofouling*, 8(2), pp. 107–120. doi: 10.1080/08927019409378266.

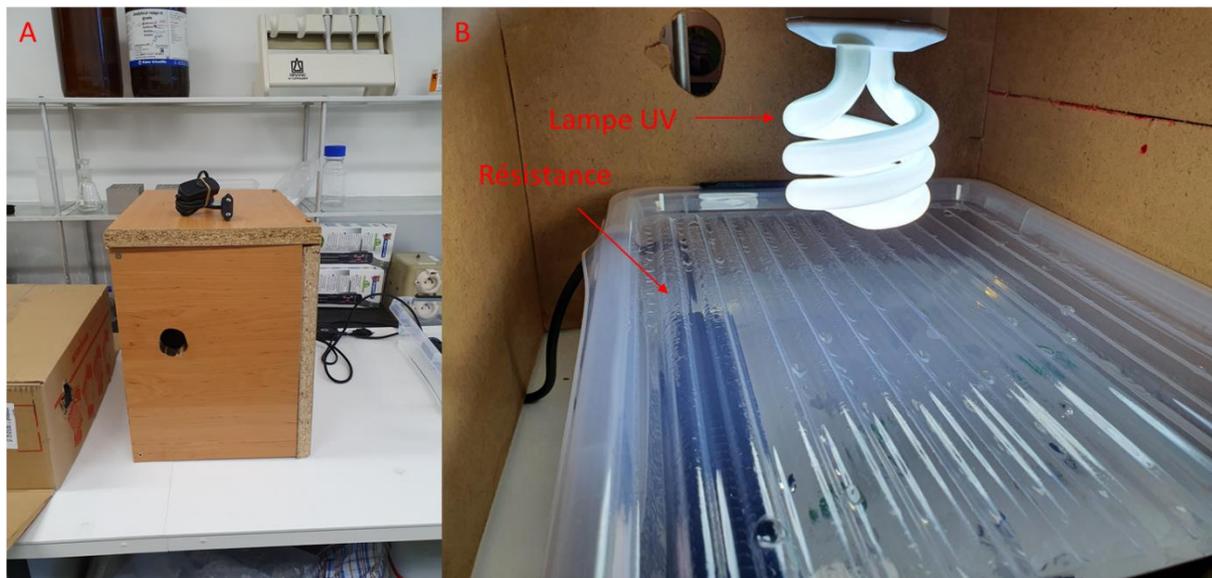
Zitko, V. & Hanlon, M. (1991) 'Another source of pollution by plastics: Skin cleaners with plastic scrubbers', *Marine Pollution Bulletin*, 22(1), pp. 41–42. doi: 10.1016/0025-326X(91)90444-W.

8. Annexes

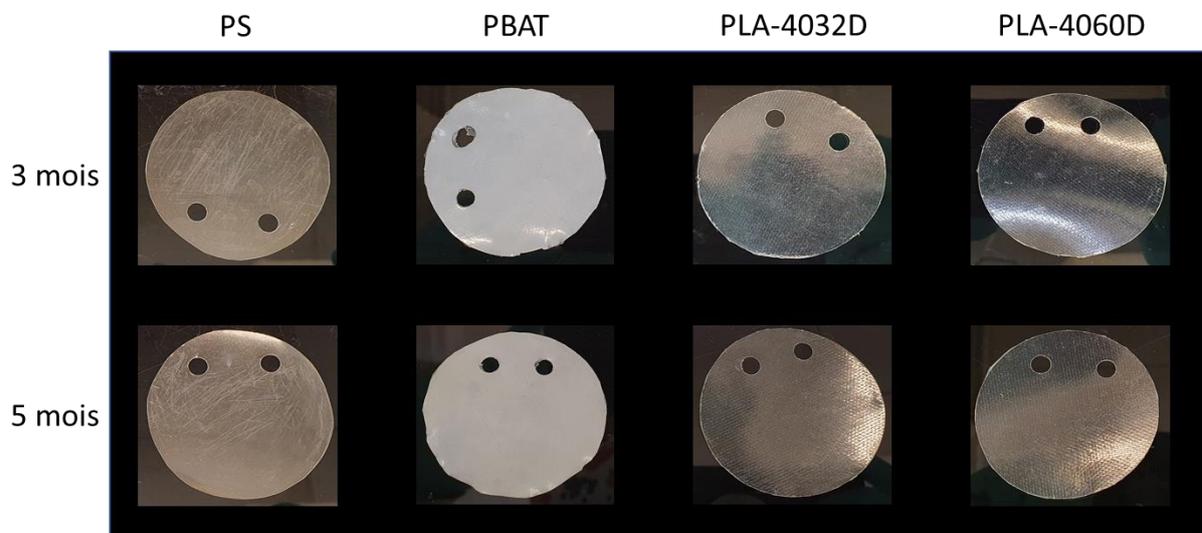
Annexe 1 : Tableau récapitulatif des dates de mise en place et de prélèvement du dispositif placé à l'Aquarium Museum de l'Université de Liège

Action	Date	Temps
Mise en place	3 mars 2020	0 mois
Prélèvement	10 juin 2020	3 mois
Prélèvement	11 août 2020	5 mois
Prélèvement	18 novembre 2020	8 mois

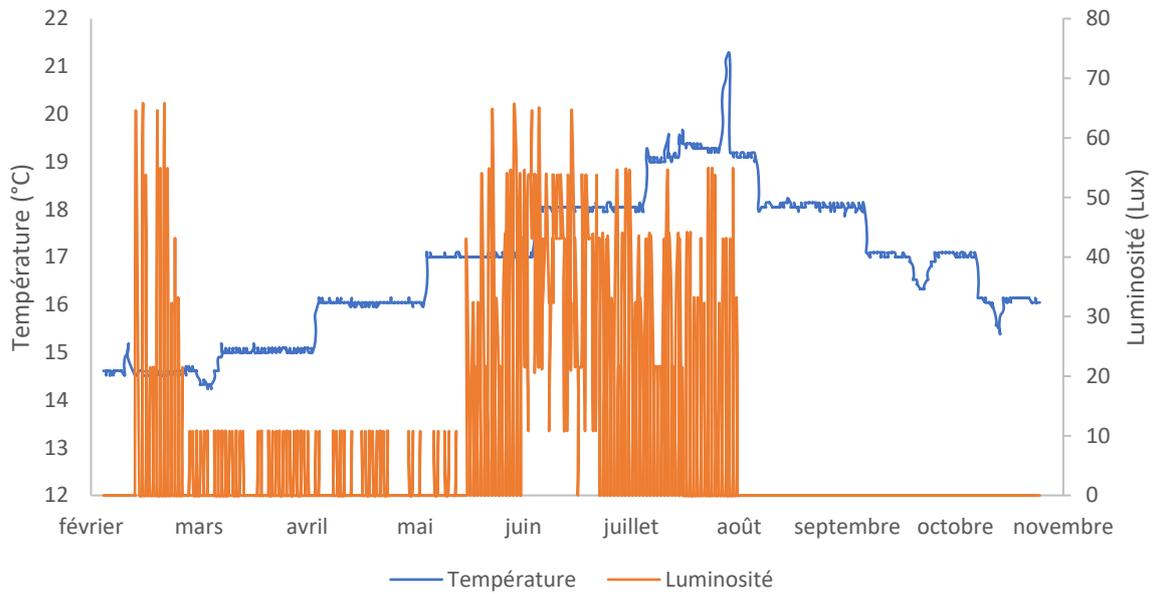
Annexe 2 : Montage expérimental de l'immersion de plastique à différente température et avec exposition ou non aux UVs vu de l'extérieur (A) et de l'intérieur (B)



Annexe 3 : Photos des films plastiques de PS, PBAT, PLA-4032D (semi-cristallin) et PLA-4060D (amorphe) après 3 et 5 mois d'immersion en milieu marin



Annexe 4 : Graphique de l'évolution de la température et de la luminosité dans le bassin d'eau de mer froide de l'Aquarium Museum de Liège durant huit mois entre le 3 mars et le 18 novembre 2020



Annexe 5 : Courbes GPC normalisées du PS (A), PBAT (B), PLA-4032D (C) et PLA-4060D (D) avant immersion (Ti) et après 3, 5 et 8 mois d'immersion en milieu marin

